Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. W. Schmid

Histologische Differenzierung der im Langzeitversuch durch Fremdstoffmetabolismus erzeugten Lebervergrößerung

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von
Gerd Staudt
Zahnarzt
aus Michelstadt

Marburg/Lahn 1969

E. Symon · Foto-Druck · 355 Marburg-Lahn · Friedrichstr. 3

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. W. Schmid

Histologische Differenzierung der im Langzeitversuch durch Fremdstoffmetabolismus erzeugten Lebervergrößerung

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von
Gerd Staudt
Zahnarzt
aus Michelstadt

Marburg/Lahn 1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. P. Karlson

Referent: Prof. Dr. W. Schmid

Correferent: Prof.Dr.Dr.habil.H.Heuser

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Inhalt

		Seite
I.	Einleitung	7
II.	Methodik	9
	A. Tierhaltung	9
	B. Tierbehandlung	9
	1) Rhythmusversuch	9
	2) Langzeitversuch	10
	C. Perorale Applikation der Substanzen	10
	D. Konzentrationen der Substanzen	10
	E. Histologische Aufbereitung	12
	F. Methoden der mikroskopischen Auswertung	13
	1) Autoradiographische Auswertung	13
	2) Auszählung der Läppchenzellzahl	14
	3) Lokalisation der Mitosen und DNS-synthetisierenden Zellen	14
	G. Mathematische Auswertung	14
III.	Versuchsergebnisse Rhythmusversuch	16
	A. Indizes und Lebergewicht	16
	1) 3-H-Thymidin-Gruppe	16
	2) 3-H-Thymidin-Gruppe + Colchizin-Gruppe	17
	3) Colchizin-Gruppe	18
	B. Lokalisation der markierten Parenchymzellen und Mitosen und Läppchenauszählung	20
	1) 3-H-Thymidin-Gruppe	20
	2) 3-H-Thymidin+Colchizin-Gruppe	23
	3) Vergleichsgruppen	23
	C. Analyse der Versuchsergebnisse	27
	1) Vorbemerkung	27
	2) 3-H-Thymidin-Gruppe	28
	3) 3-H-Thymidin+Colchizin-Gruppe	29
	4) Colchizin-Gruppe	29
	5) Lokalisation und Lobuli	30
	D. Zusammenfassung Rhythmusversuch	32

Seite

IV. Versuchsergebnisse Langzeitversuch 33
A. Überblick über die histologischen Befunde 33
1) 18 Wochen 33
2) 30 Wochen 34
B. Histometrische und autoradiographische Befunde 35
1) Vorbemerkung 35
2) Analyse der Versuchsergebnisse 35
a. 18 Wochen 35
b. 30 Wochen 49
c. Lokalisation und Indizes nach 18 und 30 Wochen 50
V. Diskussion 54
VI. Zusammenfassung 58
VII. Tabellen 59
VIII. Literatur 79

I. Einleitung

Es ist seit längerem bekannt, daß Fremdstoffe, welche in der Leber metabolisiert werden, nach wiederholter Gabe am Tier zur Vergrößerung der Leber führen können (CONNEY; KUNZ; SCHAUDE, SCHMID, SIESS; KÜLLMER). Histochemische Untersuchungen, die am Pharmakologischen Institut Marburg mit Phenobarbital, Halothan und Methoxyfluoran durchgeführt wurden, ergaben, daß es sich bei dieser Vergrößerung um eine echte Zellhypertrophie handelt, während Hyperplasie eine geringe Rolle zu spielen scheint.

Nach biochemischen Befunden kommt es schon neben einer Steigerung der Lipoid-, Protein- und Ribonucleinsäuregehalte in den ersten Tagen zu einer geringfügigen Zunahme von Desoxyribonucleinsäure, die später proportional der Zunahme des Lebergewichtes ansteigt. Es ist eine noch nicht entschiedene Frage, in welchem Verhältnis Hypertrophie und Hyperplasie in Parenchym und Extraparenchym des Leberläppchens zueinander stehen.

Zur Untersuchung dieser Frage bietet sich die Methodik der Autoradiographie unter Verwendung von 3-H-Thymidin an. Mit Hilfe dieser Methodik ist es möglich, Synthese von DNS in der Zelle mikroskopisch zu erfassen. Wenn gleichzeitig die Mitoserate erfaßt wird, besteht die Aussicht, tiefere Einblicke in das Verhältnis von Zellneubildung zu Zellhypertrophie zu erhalten.

Die Untersuchungen wurden an der weißen Maus durchgeführt. Diese Tierart besitzt in vielen Funktionen einen ausgesprochenen Tagesrhythmus. So unterliegt auch die Mitosetätigkeit zirkardianen Schwankungen. Wenn man Aussagen über das Verhalten der Zellvermehrung machen will, ist es also notwendig, zunächst einmal das zirkardiane Verhalten der Mitosetätigkeit und des Umsatzes der DNS in der Leber zu erhalten.

Aus diesem Grund wurden im ersten Abschnitt dieser Arbeit Versuche zu dieser Frage durchgeführt. Der Hauptteil der Untersuchungen betrifft Mitosetätigkeit und DNS-Umsatz nach langfristiger Einwirkung von Phenobarbital, Halothan und Methoxyfluoran. Es war weiterhin von Interesse, wie sich ein bekanntes Carcinogen, das Diäthylnitrosamin, verhält und ob sich bei

Kombination des Carcinogens mit den drei lebervergrößernden Stoffen Veränderungen gegenüber der Diäthylnitrosaminwirkung allein ergeben. Um eventuelle pH-Wirkungen des Phenobarbital ausschließen zu können, wurden Kontrolltiere mit einem sekundären Natriumphosphatpuffer, dessen pH dem der verabreichten Phenobarbitallösung entsprach und dessen Kombination mit Diäthylnitrosamin in den Versuch mit einbezogen.

Es wurden untersucht:

1) Tagesrhythmus von DNS-Synthese und Mitoserate teilweise auch nach Gabe von Colchizin.

2) a. DNS-Bildung und Mitoserate nach 18 und 30 Wochen langer peroraler Applikation von Phenobarbital und Diäthylnitrosamin allein

   b. nach 18-30 Wochen langer, täglich 1stündiger Inhalation von Halothan und Methoxyfluoran.

II. Methodik

A. Tierhaltung

Unsere Versuche wurden an männlichen Albinomäusen des Reinzuchtstammes NMR I Kisslegg durchgeführt. Die Tiere wurden in einem halbklimatisierten Stall bei einer Temperatur von 23° C gehalten. Sie erhielten das Trockenfutter Sniff, der Firma Plange in Soest, und Wasser ad libitum. Wasserlösliche Substanzen wurden mit dem Trinkwasser eingegeben.

Für die Rhythmusversuche wurden die Tiere unmittelbar dem Stall entnommen. Für die Versuche mit lebervergrößernden Substanzen entstammten sie einer Versuchsserie, die in der Dissertation MICHEL näher beschrieben ist. Dabei waren mit den in der Einleitung genannten Kombinationen insgesamt 466 Mäuse angesetzt worden, wobei auf jede Versuchsserie 36-72 Mäuse kamen.

Um eine möglichst hohe Mitoseausbeute zu erhalten, wurde bei dem Langzeitversuch die Tötung morgens um 8^h durchgeführt.

B. Tierbehandlung

1) Rhythmusversuch

Die Versuche wurden im März 1966 durchgeführt. Im Abstand von je 4 Stunden (0^h, 4^h, 8^h, 12^h, 16^h, 20^h) wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, nachdem 40 min zuvor je 50 uC 3-H-Thymidin bzw. 15 γ Colchizin pro Tier intraperitoneal injiziert worden war.

Es wurden gemessen: 1. Körpergewicht, 2. Lebergewicht.

Es wurden 3 Gruppen angesetzt von je 18 Mäusen.

1. Gruppe H^3 : nur 3-H-Thymidin
2. Gruppe $C+H^3$: Colchizin + 3-H-Thymidin
3. Gruppe C : nur Colchizin.

Als Vergleichswerte wurden die Auswertungen früherer Versuchstiere herangezogen.

4. Schmidt I, ShI, jüngere Tiere, Lebergewicht ca. 1500 mg
5. Schmidt 2, Sh 2, ältere Tiere, " ca. 2000 mg
6. Thal, Th , alte Tiere, " ca. 2500 mg.

2) Langzeitversuch

Eine perorale Applikation wurde mit folgenden Fremdstoffen durchgeführt:

1. Diäthylnitrosamin
2. Phenobarbital
3. Na_2HPO_4
4. Kombinationen von 2 und 3 mit Diäthylnitrosamin.

Eine Inhalationsbehandlung mit dem in der Arbeit MICHEL beschriebenen Narkosegerät sowie dem zugehörigen Narkosekasten wurde mit folgenden Gasnarkotika durchgeführt:

1. Halothan
2. Methoxyfluoran
3. Kombinationen von Diäthylnitrosamin mit Halothan und Methoxyfluoran.

C. Perorale Applikation der Fremdstoffe

Die zur peroralen Applikation im Trinkwasser angebotenen wasserlöslichen Substanzen Phenobarbital-Natrium, Diäthylnitrosamin und Na_2HPO_4 waren in ihrer Konzentration so berechnet, daß die gewünschte Dosis in 0,2 ml Trinkmenge/g Körpergewicht und Tag enthalten war, der normalen Flüssigkeitsaufnahme der Kontrolltiere. Durch Rückwiegen wurde außerdem jeden Tag die real aufgenommene Menge Trinkflüssigkeit bestimmt und auf mg/kg Maus umgerechnet.

D. Konzentrationen der Substanzen

1) Diäthylnitrosamin

Die Substanz wurde zunächst in 0,005%iger Konzentration angeboten (täglich aus einer Stammlösung frisch zubereitet). Zu Beginn des Versuchs wurden etwa 10 mg/kg Körpergewicht aufgenommen. Eine höhere Konzentration wurde in der 5. Versuchswoche notwendig (0,007%) da die anfängliche Flüssigkeitsaufnahme von 9-10 mg/kg auf 7-8 mg/kg sank. Die Tiere verminderten er-

neut ihre Trinkmenge und erreichten in der Endphase des Ver= suchs eine sehr kleine Tagesdosis von ca. 3 mg/kg.

2. Phenobarbital

Eine 0,1%ige Konzentration, entsprechend einer erwarteten Tagesdosis von 200 mg/kg Körpergewicht wurde von den Tieren nicht in befriedigender Menge aufgenommen. Die Konzentration wurde deshalb auf 0,12% erhöht; damit wurde die gewünschte Do= sis von 0,2 g/kg erreicht.

3. Na_2HPo_4

Die Anfangsdosis von 0,2% Na_2HPo_4 entsprechend 400 mg/kg Körpergewicht wurde von den Tieren akzeptiert.

4. DÄNA-Phenobarbital

An den Konzentrationen wurde gegenüber den reinen Substan= zen nichts geändert.

5. DÄNA-Na_2HPo_4

Auch hier wurde gegenüber den reinen Substanzen nichts ge= ändert.

6. Halothan

Der geeichte Verdampfer der Firma Dräger ermöglichte die genaue Einhaltung der gewünschten Konzentration des Sauerstoff-Halothan-Gemisches, unter Berücksichtigung der Verdampfungs= temperatur. Der Sauerstoff-flow zum Verdampfer betrug 3,2 l/ min. Alle mit Halothan behandelten Tiere inhalierten täglich, außer sonntags, 1 Stunde lang 0,7% Halothan (50% Seitenlagen= konzentration).

7. Methoxyfluoran

Die Tiere inhalierten täglich außer sonntags eine Konzentra= tion von 0,4% Methoxyfluoran, entsprechend einer 50%igen Sei= tenlagenkonzentration. Benutzt wurde ein für diese Substanz

umgeeichter Ätherverdampfer der Fa. Bosco in Amsterdam. Für die Kombinationen mit DÄNA gelten die gleichen Konzentrationen, wie sie für die Einzelsubstanzen festgelegt wurden.

E. Histologische Aufbereitung

Nach einer Versuchsdauer von 18 Wochen wurden erstmalig aus jeder Versuchsgruppe 5 Tiere entnommen. Zur Gewinnung von Autoradiogrammen wurde 40 Minuten vor der Dekapitation, der optimalen Inkorporationszeit 3-H-Thymidin intraperitoneal injiziert. Die Injektion wurde nach den Angaben von PILGRIM, ERB und MAURER durchgeführt. (TRA. 120 Thymidine-methyl-T, spezifische Aktivität 3,0 curies/mMol, Amersham) 5 ml der Stammlösung mit 5 m Curie Gesamtaktivität wurden mit phys. Kochsalzlösung auf 10 ml aufgefüllt. Den Tieren wurde 0,1 ml i.p. eingegeben, entsprechend einer Dosis von 50 u Curie.

Um Blutstauungen in der Leber zu verhindern, wurden die Tiere entblutet, Leber, Niere, Milz, Lunge, Magen, Peritoneum und Haut wurden entfernt und in einem Gemisch von 0,5% Trichloressigsäure und 6% Formalin unter Zusatz von 0,5 mg/ml inaktivem Thymidin fixiert. Die Leber wurde vor der Fixation von Zwerchfell und großen Gefäßen befreit, gewogen und so das relative Lebergewicht (mg Lebergewicht/g Körpergewicht) bestimmt. Die fixierten Organe wurden zur weiteren histologischen Aufbereitung Herrn Dozent Dr. THOMAS übergeben (Pathologisches Institut der Universität Bonn), der die Präparate auch beurteilte.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten für eine Fettfärbung mit Scharlachrot wurde in Marburg ein kleiner Leberlappen in 10%igem Formalin fixiert. Die Färbung der Präparate, sowie das Aufbringen der photographischen Platte erfolgte durch Frau Dr. G. SCHAUDE in Zusammenarbeit mit Herrn MICHEL. Angewendet wurden H-E-Färbungen und PAS-Färbungen zur Darstellung der Mitosen.

F. Methoden der mikroskopischen Auswertung

1) Autoradiographische Auswertung

Benutzt wurde das Ortholux-Mikroskop der Fa. Leitz mit einer Objektivvergrößerung von 1:100 und Ölimmersion,Periplan-Okulare 10x und zur Auszählung der Zellen, Mitosen, DNS-synthetisierenden Zellen, Extraparenchymzellen, deren Mitosen, 3-H-Thymidin markierter Extraparenchymzellen das "Leukodiff MS-"Gerät der Fa. Boskamp in Bonn.

Aus je 20 Gesichtsfeldern wurde die Parenchym- und Extraparenchymzellzahl bestimmt. Zur Auszählung der Mitosen und markierten Zellen gelangten 750 Gesichtsfelder pro Präparat.

Bewußt ignoriert wurden Gesichtsfelder, in denen größere Gefäße, Glissonsche Trias, extrem viel Extraparenchym, gehäuft Gallengangswucherungen, sowie Pseudogallengänge gefunden wurden, wie dies besonders bei Diäthylnitrosamin und seinen Kombinationen der Fall war.

Als DNS-bildend wurden alle diejenigen Zellen gewertet, deren Gehalt an Silberkörnern mindestens 10 betrug. Eine genauere Bestimmung der Silberkornzahl ließe sich mit dem mir leider nicht zur Verfügung gestandenen Mikroskop-Photometer der Fa. Leitz durchführen. (Inzwischen mit diesem Gerät gewonnene Befunde bestätigen meine Ergebnisse.)

Die Mitosen des Parenchyms wurden in einem zweiten Arbeitsgang an PAS-Präparaten erfaßt.

Bindegewebsmitosen, die nach dem gleichen Schema erfaßt wurden, waren wesentlich schwieriger zu beurteilen. Deshalb wurden je nach Untersucher verschiedene Werte gewonnen. Aus diesem Grund ist die Aussagekraft des Mitose-Index-Extraparenchym mit Vorbehalt zu betrachten. Die Erfassung der Leberzellmitosen ist ebenfalls mit allerdings kleineren subjektiven Schwierigkeiten belastet. Vergleichszählungen von verschiedenen Mitarbeitern unseres Instituts an gleichen Präparaten ergaben Schwankungen bis zu einem Index-Wert von 0,4 pro Präparat. Um eine geeignete Vergleichsbasis zu haben, wurden von uns Mitosen nur von ihrer frühen Anaphase bis zur späten Metaphase registriert. Es ergab sich daraufhin eine weitgehende Übereinstimmung der Zählergebnisse. Für ein Präparat benötigte ich eine Auswertungszeit von 3/4 - 1 3/4 Stunden.

2) Auszählung der Zellzahl pro Läppchen

Benutzt wurde wiederum das Ortholux-Mikroskop der Fa.Leitz, Objektivvergrößerung 1:40, Periplan-Okular 10x. Ein für diesen Zweck hergerichtetes Okular, in das ein Deckglas mit 3 konzentrischen Kreisen eingelegt war, ermöglichte die Erfassung eines entsprechend großen Leberläppchens und dessen Unterteilung in einen zentralen, intermediären und peripheren Ausschnitt. Auf Grund der so gesetzten Grenzen kamen nur ausgesuchte Läppchen mit kleiner Vena centralis zur Auswertung. Auch hier wurden große Gefäße, Anhäufungen von Extraparenchymzellen und vermehrtes Auftreten von Gallengängen ignoriert.

3) Lokalisation der Mitosen und der DNS-synthetisierenden Zellen

Die Problemstellung ergab die Notwendigkeit einer exakten Örtlichkeitsbestimmung der aktiven Zellen. Mit dem Ortholux-Mikroskop, Objektivvergrößerung 1:100, Ölimmersion gefundene Mitosen wurden direkt anschließend mit einem Fadenkreuzokular 8 x lokalisiert, nachdem die Objektivvergrößerung reduziert worden war, um das ganze Läppchen im Blickfeld zu haben. Nach Möglichkeit wurden auf diese Weise 30 Mitosen pro Präparat erfaßt. Das gleiche Verfahren bot sich für die Lokalisation der DNS-synthetisierenden Zellen an.

G. Mathematische Auswertung

Zur Auswertung der Zählergebnisse wurden angewendet:
Arithmetisches Mittel
Prozentrechnung
Index-Berechnung
Die Streuungsberechnungen, Signifikanzberechnungen (T-Test nach STUDENT), Mittelwertsbestimmungen, Indexberechnungen wurden in der zentralen Rechenanlage Marburg mit dem "Alcor Tr4" ausgeführt (Dozent Dr. TRINKAUS).

Mittelwerte: arithmetisches Mittel

$$m = \frac{E\ X}{n}$$

m = Mittelwert
X = Einzelwert
n = Anzahl der Einzelwerte.

Die gefundenen Daten des Langzeitversuchs wurden in Prozent umgerechnet, wobei die Kontrollen = 100 gesetzt wurden. Erst auf diese Weise sind Vergleiche möglich.

Der Index gibt die Anzahl markierter bzw. in Mitose befindlichen Zellen pro 100 Zellen an. Das entspricht dem prozentualen Anteil.

Die Streuung der Kollektivwerte m berechnet sich nach der Formel:

$$m = \frac{S(x_1)^2 - Sx_1\ \bar{x}}{n(n-1)}$$

$m, \bar{x}$ = Mittelwert
x_1 = Einzelwert
n = Anzahl der Einzelwerte

Statistische Sicherung der Differenz zweier Mittelwerte:

Die Differenz der Kollektivwerte zu den Kontrollmittelwerten bzw. zu Vergleichen herangezogenen Mittelwerten anderer Kollektive wurde nach der t-Verteilung von STUDENT ermittelt.

$$t = \frac{(x_i^2 - \bar{x}\ \bar{x})(\bar{x}^2 - \bar{x}'\ \bar{x}')}{n + n' - 2} \qquad \frac{n + n'}{n\ \ n'}$$

$\bar{x}$, = Gruppenmittelwert
$\bar{x}'$ = Kontrollmittelwert
n = Anzahl der Einzelwerte
n' = Anzahl der Kontrolle

Die p-Werte (Wahrscheinlichkeit) wurden den Geigy-Tabellen entnommen. Als statistisch gesichert wurde der Wert von p=0,02 (98% Wahrscheinlichkeit) angenommen.

Prozentrechnungen wurden mit dem Dreisatz durchgeführt.

III. Versuchsergebnisse Rhythmusversuch

A. Indizes und Lebergewicht

1) 3-H-Thymidin-Gruppe

Das rel. Lebergewicht zeigt ein Maximum um 8 h, ein Minimum um 20 h (Abb. 1). Diesen Werten entgegengesetzt sind die Maxima und Minima der Parenchym- und Extraparenchymzellzahl. Hier liegen die Maxima bei 4 h und 16 h, die Minima beider bei 8 h. Also geht mit fortschreitendem Lebergewicht die Leber- und Bindegewebszellzahl/Gesichtsfeld zurück.

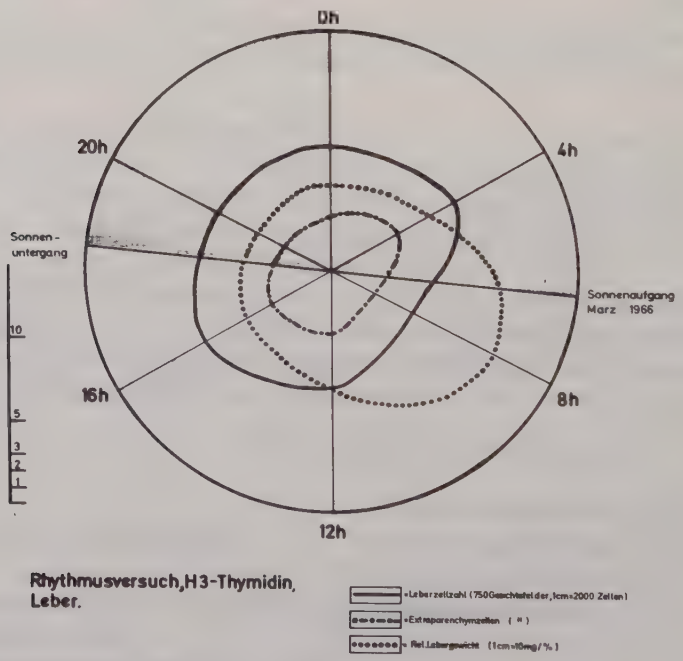

Abb. 1

Der 3-H-Thymidin-Index (Abb. 2 + Abb. 8) der Bindegewebszellen hat sein Maximum um 4 h, sein Minimum um 24 h. Demgegenüber hat der 3-H-Thymidin-Index des Parenchyms seinen Gipfel zwischen 4 h und 8 h, den Tiefpunkt um 24 h. Der Mitose-Index hat sein Maximum um 12 h, sein Minimum um 16 h.

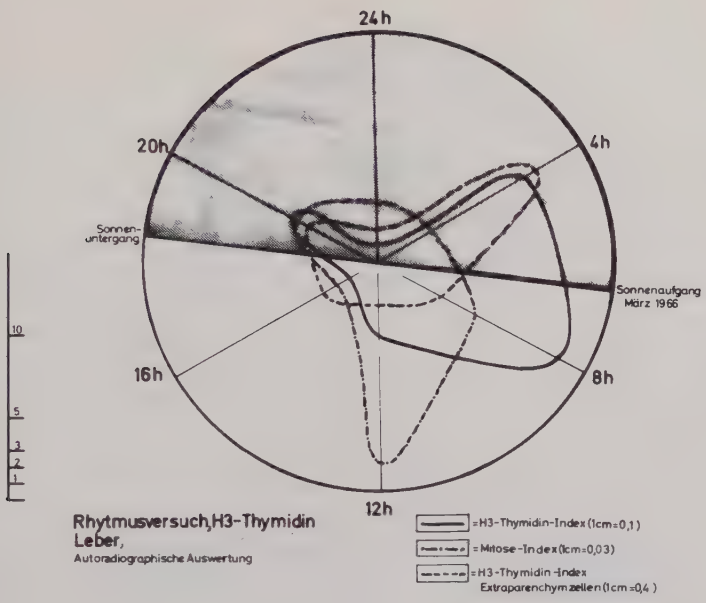

Abb. 2

2) 3-H-Thymidin + Colchizin-Gruppe

Der Kurvenverlauf des 3-H-Thymidin-Index der Parenchym= zellen entspricht in Maximum und Minimum dem der Gruppe 3-H-Thymidin (Abb. 3). Es kommt weiterhin zum Ausdruck, daß sich die aktive Phase durch die Einwirkung des Colchizins verlän= gert. Der 3-H-Thymidin-Index-Extraparenchym hat sein Maximum periodisch bei 8 h und 20 h, sein Minimum um 24 h. Hier wird also unter der Einwirkung des Colchizins eine Verzögerung der aktiven Phase angezeigt; es fehlt der zu erwartende zwei= te Gipfel. Dagegen ist eine generelle diffuse Mitosetätigkeit in den Nachtstunden von 20 h bis 4 h zu erkennen.

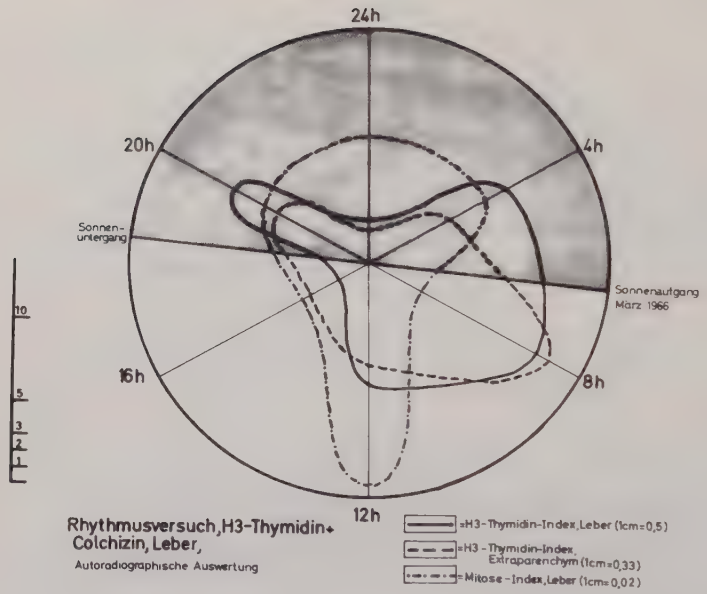

Abb. 3

3) Colchizin-Gruppe

Unter Einwirkung des Colchizins ergibt sich eine Auflösung bzw. Abrundung der Maxima und Minima, sowohl des Mitose-Index-Parenchymzellen als auch des Mitose-Index-Extraparenchymzellen im Sinne einer Stagnation in der Metaphase zu sämtlichen Tageszeiten (Abb. 4).

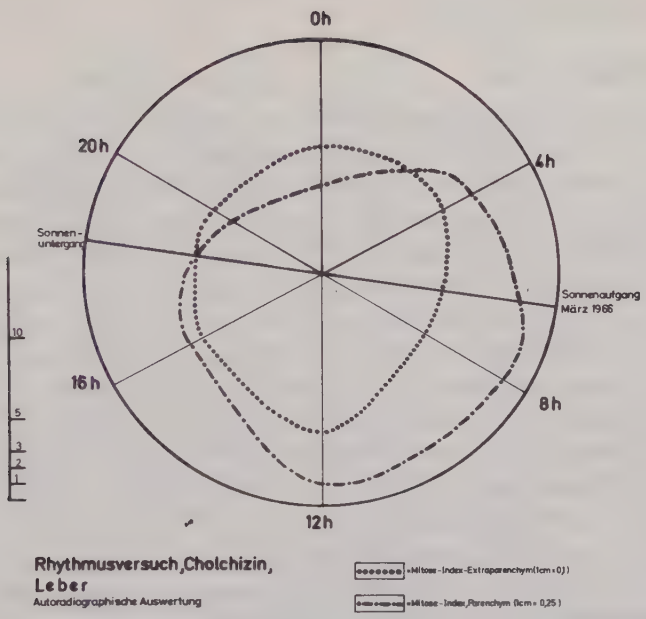
0h
4h
8h
12h
16h
20h
Sonnen-
untergang
Sonnenaufgang
März 1966
10
5
2
1
Rhythmusversuch, Cholchizin,
Leber
Autoradiographische Auswertung
= Mitose-Index-Extraparenchym (1cm = 0,1)
= Mitose-Index, Parenchym (1cm = 0,25)

Abb. 4

B. Lokalisation der markierten Parenchymzellen und der Mitosen und Läppchenauszählung

1) 3-H-Thymidin-Gruppe

Um 24 h hat die Gesamtzellzahl pro Läppchen ihren Höhepunkt (Abb. 5 und 6). Eingezeichnet sind weiterhin die relativen Anteile 3-H-Thymidin markierter Parenchymzellen. Deutlich erkennbar sind die Gipfel der zentralen und intermediären Bereiche um 20 h, während im peripheren Bereich eine diffuse Verteilung der 3-H-Thymidin-markierten Zellen auf alle Tageszeiten zu beobachten ist. Die Kurve der Gesamtzellzahl bezieht sich auf die absoluten Zahlen, die der Lokalisation auf die relativen Anteile. Vorwiegend läuft die Tätigkeit der DNS-synthetisierenden Zellen also im zentralen Bereich ab, ebenso findet sich dort der quantitativ größte Anteil der Mitosen.

Bei der Verteilung der Mitosen ergibt sich das gleiche Bild wie bei den markierten Zellen.

In Abb. 7 sind die absoluten Werte der Lokalisation für die 3 Bezirke in Säulenform dargestellt. Dazu die Läppchenzellzahl in der prozentualen Aufteilung. Es wurden pro Präparat 3 Lobuli ausgezählt. Für jede Uhrzeit standen 3 Präparate zur Verfügung. Um 12 h tritt eine Verminderung des peripheren Anteils ein zugunsten des intermediären Bereichs. Zu den übrigen Tageszeiten verhalten sich die drei Anteile gegeneinander wie 1:5:9. Die Lokalisation der 3-H-Thymidin-markierten Parenchymzellen zeigt zu allen Uhrzeiten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der drei Anteile. Bei der Lokalisation der Parenchymzell-Mitosen zeigt sich jedoch eine deutliche Vergrößerung des zentralen Anteils um 4 h und um 8 h.

Die Betrachtung des Mitose-Index für den gleichen Zeitraum ergibt, daß bei gleichbleibendem Mitose-Index um 4 h und 8 h trotzdem die Mitoserate des zentralen Bereichs ansteigt, demnach das Wachstum des Parenchymgewebes von zentral ausgeht.

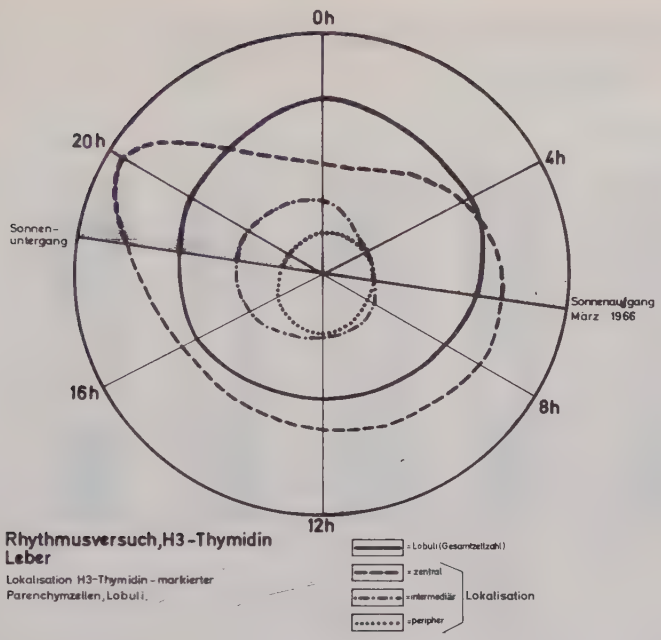
0h
4h
8h
12h
16h
20h
Sonnen-
untergang
Sonnenaufgang
März 1966
Rhythmusversuch, H3-Thymidin
Leber
Lokalisation H3-Thymidin-markierter
Parenchymzellen, Lobuli.
= Lobuli (Gesamtzeitzahl)
= zentral
= intermediär
= peripher
Lokalisation

Abb. 5

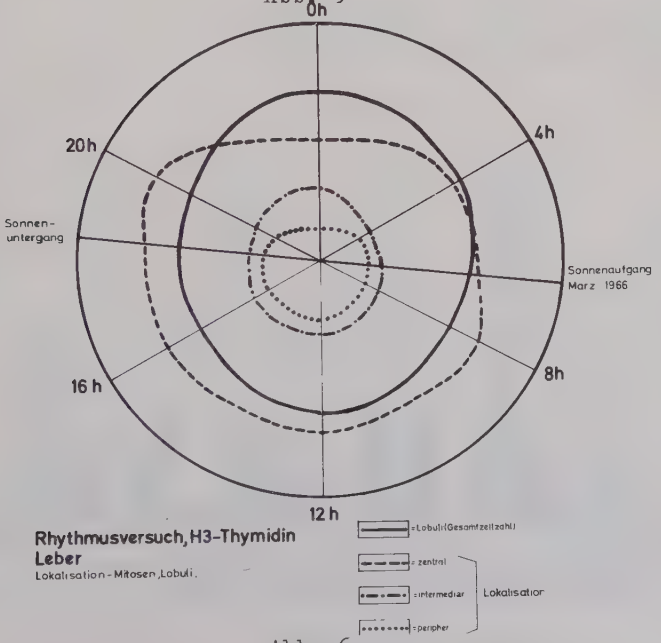
0h
4h
8h
12 h
16 h
20h
Sonnen-
untergang
Sonnenaufgang
März 1966
Rhythmusversuch, H3-Thymidin
Leber
Lokalisation-Mitosen, Lobuli.
= Lobuli (Gesamtzeitzahl)
= zentral
= intermediär
= peripher
Lokalisation

Abb. 6

Rhythmusversuch, H_3-Thymidin,
Lokalisation+Lobuli

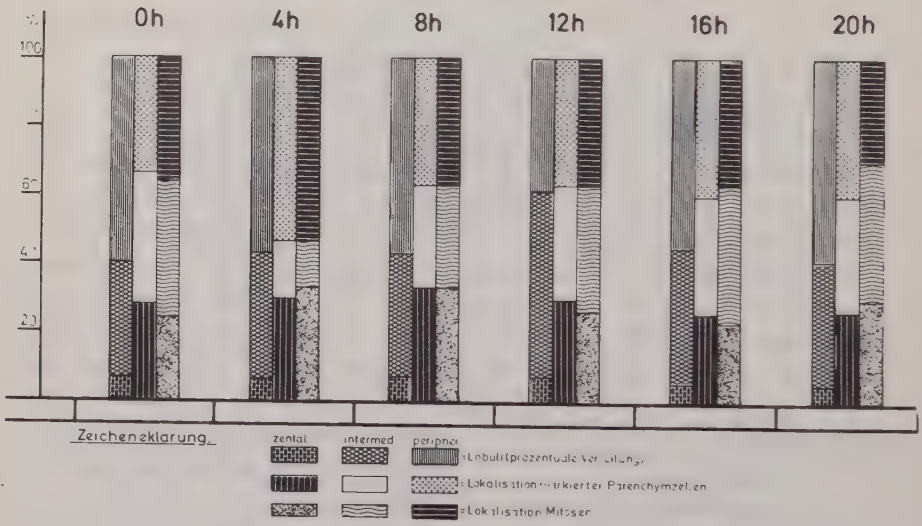

Abb. 7

Rhythmusversuch, H_3-Thymidin
Indizes

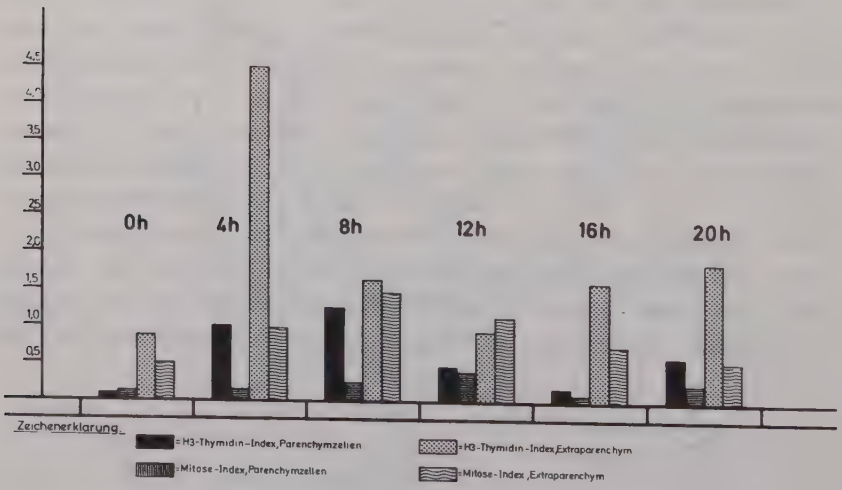

Abb. 8

2) 3-H-Thymidin-Colchizin-Gruppe (Abb. 9)

Während unter dem Einfluß des Colchizins allein (Abb. 10) an der Läppchenstruktur und der Zellzahl keine Veränderung auftritt, ist dies bei der Lokalisation der Mitosen der Fall. Es findet sich eine bemerkenswerte Verringerung der peripheren Mitosen, zugunsten der zentralen und intermediären Anteile, wobei hauptsächlich intermediär eine Zunahme der Mitosen zu registrieren ist (Abb. 9). Bei der Kombination Colchizin + Thymidin gilt für die Mitosen das gleiche wie für Colchizin. Lediglich der 16 h-Wert zeigt eine signifikante Abweichung zugunsten des intermediären Bereichs. Die Lokalisation der 3-H-Thymidin markierten Parenchymzellen zeigt um 8 h einen deutlichen Anstieg im zentralen Bereich und um 4 h eine Verminderung der markierten Zellen im peripheren Gebiet. Alle anderen Uhrzeiten bewegen sich im Rahmen der üblichen gefundenen Werte.

3) Vergleichsgruppen (siehe Seite 9) (Abb. 11)

Um Anhaltspunkte über den Einfluß des Lebensalters auf die Rhythmik der Zellteilung zu gewinnen, wurden Versuchsgruppen herangezogen, die in Lebergewicht, Alter und Schlachtungszeit stark divergieren. Da das Alter nicht einwandfrei bestimmt werden konnte, wurde als Maß die Lebergröße verwendet.

1. H3 = 1966, 1460 mg mittleres Alter, Zucht KISSLEGG
2. Th = 1963, 2000 mg ältere Tiere, Zucht Tübingen
3. SI = 1962, 1949 mg junge Tiere, Zucht Tübingen
4. SII= 1962, 1500 mg ältere Tiere, Zucht Tübingen

Aus der Darstellung der Mitose-Indizes (Abb. 11) ist zu erkennen, daß der 3-H-Thymidin-Index immer größer ist als der der Vergleichsserien, und zwar über alle 24 Stunden hinweg. Damit erhebt sich der Verdacht, daß 3-H-Thymidin Mitosen aktiviert. Die Indizes der gleichgewichtigen Tiere der SII-Gruppe sind um das 9-25fache niedriger als die der 3-H-Gruppe, da hier kein H-Thymidin injiziert wurde. Die Indizes der Gruppe SI, jüngere Tiere, sind größer als die der SII-Gruppe. Der Index der Th-Gruppe (lediglich 12 h-Wert) entspricht dem der Gruppe SI. Aus der Verteilung bei der Mitosen-Lokalisation

(Abb. 12) ist ein deutlicher Anstieg der zentralen Mitosen bei SI und SII zu erkennen. Peripher geht die Mitoserate zurück. Bei der Th-Gruppe sind die Mitosen im intermediären Bereich vermehrt. Es kommt dadurch zum Ausdruck, daß ältere Tiere eine Vergrößerung der Leber durch eine Vermehrung der Mitosen erreichen. Tagesrhythmik, jahreszeitliche Schwankungen bringen eine Verschiebung der Mitosen mit sich. Die Mitose-Indizes sind also nur bedingt miteinander zu vergleichen.

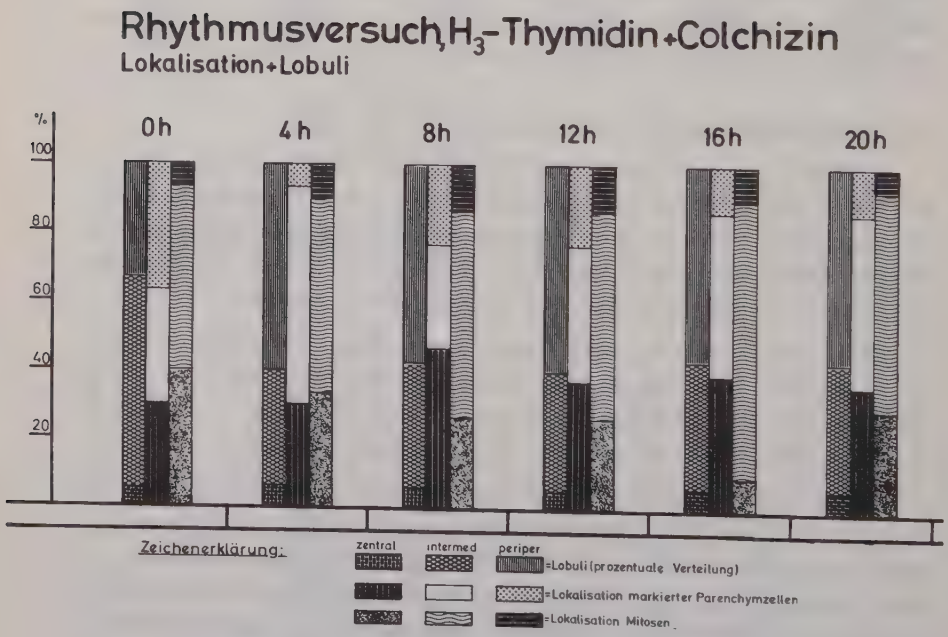

Abb. 9

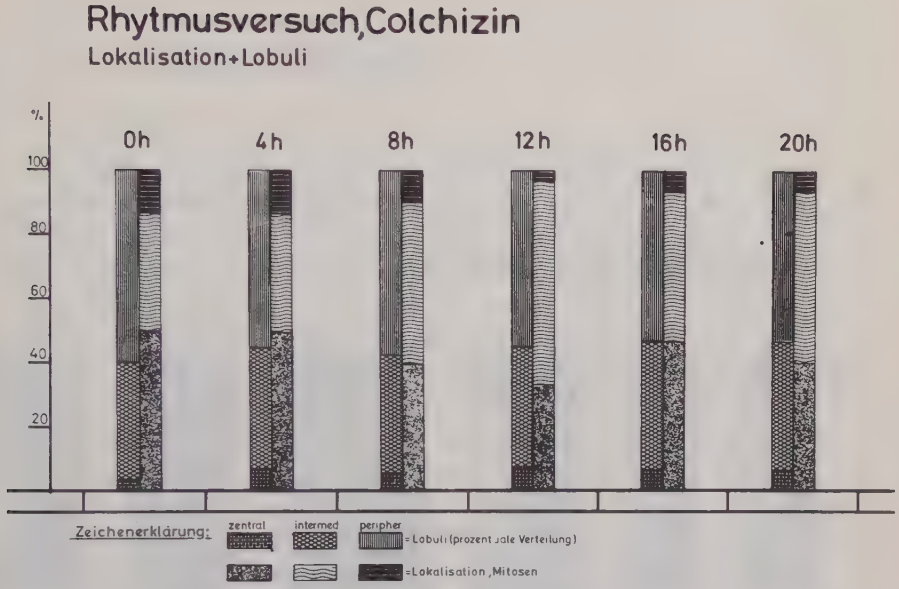
Rhytmusversuch, Colchizin
Lokalisation + Lobuli
%
100
80
60
40
20
0h
4h
8h
12h
16h
20h
Zeichenerklärung:
zentral
intermed
peripher
= Lobuli (prozentuale Verteilung)
= Lokalisation, Mitosen

Abb. 10

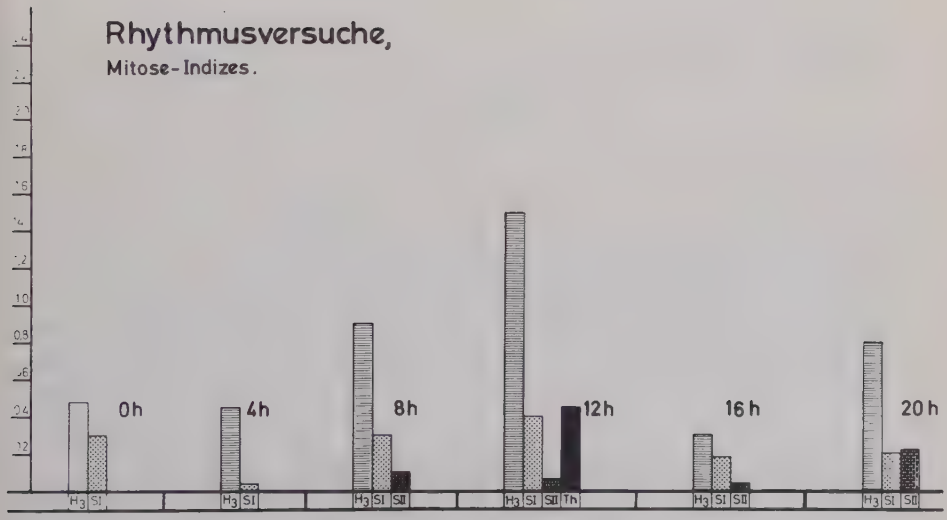
Rhythmusversuche,
Mitose-Indizes.
0h
4h
8h
12h
16h
20h
H3
SI
SII
Th

Abb. 11

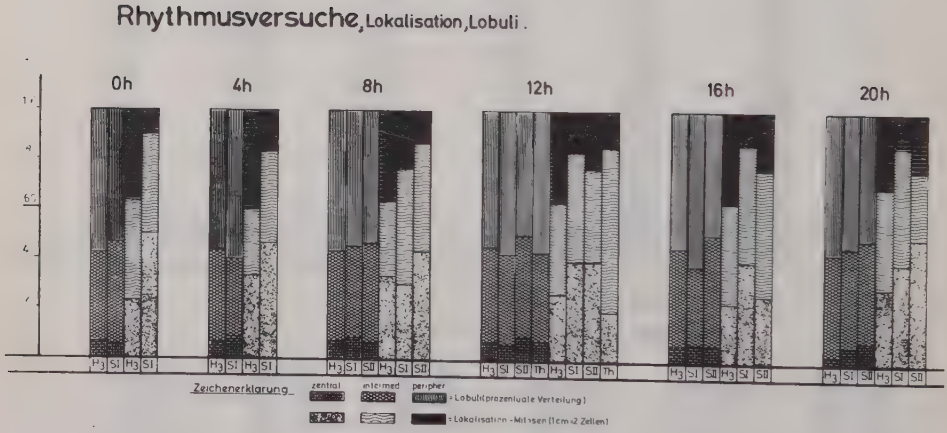
Rhythmusversuche, Lokalisation, Lobuli.
0h
4h
8h
12h
16h
20h
Zeichenerklärung
zentral
intermed
peripher
= Lobuli (prozentuale Verteilung)
= Lokalisation - Mitosen (1 cm = 2 Zellen)

Abb. 12

C. Analyse der Versuchsergebnisse

1) Vorbemerkung

Die Freßlust der Tiere ist in den frühen Morgenstunden besonders groß. Sie bewirkt eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten in der Leber. Diese findet ihren Niederschlag in einer zeitweisen Vergrößerung des Leberzellvolumens. Solche Volumenschwankungen des Organs sind auch bei BUCHER beschrieben. Es handelt sich also bei der rhythmischen Erhöhung des relativen Lebergewichts nicht um eine Vermehrung von Parenchymzellen, sondern vielmehr um eine metabolische Volumenschwankung, rein nahrungsphysiologisch bedingt. Aus der zur gleichen Zeit, morgens um 8 h, registrierten Verminderung der Parenchym- und Extraparenchymzellzahl ist ebenfalls auf eine Vergrößerung des Zellvolumens zu schließen. Da für alle Tageszeiten ein flächengleicher Ausschnitt des Leberläppchens zur Auszählung gelangte, kann es sich nämlich bei Änderungen der Zellzahl nur um Volumenschwankungen der Zellen handeln. Es ergibt sich daraus eine umgekehrte Proportionalität von Zellzahl und Zellvolumen. Dies wird bestätigt bei der Betrachtung der 20 h-Werte. Die in den Abendstunden einsetzende Ruhe- und Erholungsphase des Parenchyms von Leistungen im intermediären Stoffwechsel führt zu einer Verringerung des Zellvolumens. Damit wird der Wert für die Zellzahlen größer als um 8 h.

Der zweite Gipfel der DNS-Synthese um 20 h, vielleicht Ausdruck einer nahrungsphysiologischen Stoffwechseltätigkeit, ist nicht so stark ausgeprägt wie die am Morgen, da die Tiere nachmittags nur vereinzelt Nahrung aufnehmen. Dementsprechend liegen die Werte für die Parenchym- und Extraparenchymzellzahl mit ihren Maxima kurz vor Einsetzen der Synthesephasen, d.h. es hat noch keine Anreicherung der Zelle mit Stoffwechselprodukten stattgefunden.

Zusammenfassung:

Es findet eine nahrungsphysiologisch bedingte Vergrößerung der Leberzellen bzw. der gesamten Leber statt, morgens um 8 h ist das Maximum der Volumenerhöhung erreicht, abends um 20 h findet sich ein weiterer kleinerer Gipfel.

2) 3-H-Thymidin-Gruppe

Die Syntheseleistung der Parenchymzellen beginnt in den frühen Morgenstunden um 4 h und geht in unverminderter Aktivität 4 Stunden lang weiter. Danach folgt ein starker Rückgang. Eine weitere Synthesephase tritt um 20 Uhr auf, die jedoch nur kurze Zeit anhält. Die S-Phase der Extraparenchymzellen hat ein Maximum lediglich um 4 h am Morgen und ist zeitlich auf etwa eine Stunde beschränkt. Das bedeutet, daß gleichzeitig mit dem Beginn der Nahrungsaufnahme die Syntheseleistung der Zellen einsetzt. Es ist verständlich,daß die auf einer höheren Differenzierungsstufe stehenden Parenchymzellen eine weitaus längere S-Phase besitzen, um den mannigfaltigen Anforderungen gerecht werden zu können, die auf Grund der Stellung im intermediären Stoffwechsel an sie gestellt werden. Demgegenüber benötigen die Extraparenchymzellen mit ihrer niederen Entwicklungsstufe eine kurze S-Phase, die sich zum Großteil auf die für den eigenen Proteinbedarf bestimmten sog. Zelleigenleistungen beschränkt. In dem nicht stark ausgeprägten Gipfel um 20 h, der zweiten Synthesephase, sehe ich eine Syntheseleistung der Zelle, die sich auf den eigenen regeneratorischen Bedarf begrenzt.

Der Mitose-Index hat ein Maximum um 12 h, 4 Stunden nach der S-Phase. Wie auch in anderen Arbeiten beschrieben (PILGRIM) folgt die Mitosephase etwa 4-8 Stunden nach der S-Phase, wobei eine starke Abhängigkeit vom Grad der Differenzierung festgestellt wurde. Je höher der Grad der Differenzierung, um so länger ist die prämitotische Phase.

Der aus der Kurve ersichtliche Tiefpunkt für die synthetisierenden Zellen liegt um Mitternacht. Da zu diesem Zeitpunkt keine Nahrungsstoffe zugeführt werden, ist ein relativer Mangel an Proteinen und spezifischen RNS in der Zelle zu vermuten.

Zusammenfassung:

Die Synthese-Phase der Parenchymzellen dauert auf Grund ihres hohen Differenzierungsgrades 4 Stunden, während die des Extraparenchyms nur 1 Stunde dauert. Die Mitose-Phase ist der S-Phase um 4 Stunden nachläufig. Die späte S-Phase liegt bei 20h und ist praktisch um einen halben Tag nach der ersten S-Phase

anzusetzen. Es handelt sich hierbei um einen zirkardianen Rhythmusprozeß, der organspezifisch ist.

3) 3-H-Thymidin+Colchizin-Gruppe

Das Mitosegift Colchizin, das in der Mitosephase die Spindelbildung unterdrückt, wurde in unseren Versuchen verwendet, um die Mitosen in dem Zeitraum von 4 Stunden auflaufen zu lassen. Im histologischen Bild waren zwar idiomere und große, offenbar polyploide Zellkerne zu finden, die Mitoserate wurde erhöht. Jedoch zeigte sich eine ausgeprägte gipfellose Mitose-Phase über einen Zeitraum von 6-8 Stunden, also eine Verschleierung der Mitose-Phase. Dies möchte ich auf die Einwirkungsdauer, den dadurch entstandenen Mitoseauflauf und den Ansatzpunkt des Colchizins zurückführen sowie auf die mit dem Einwirken des Colchizins verbundene Änderung der Proteinstruktur im Zytoplasma. An dem Kurvenverlauf für die S-Phase hat sich unter der Einwirkung des Colchizins nichts geändert. Dies gilt aber nur für das Parenchym. Für das Extraparenchym hat sich eine Verschiebung der S-Phase um 4 Stunden ergeben. Die Ursache für diese Verschiebung ist nicht abgeklärt.

Zusammenfassung:

Das Colchizin ändert im Parenchym den Tagesrhythmus, indem es den Spitzenwert der Mitosetätigkeit über einen Zeitraum von 6-8 Stunden ausdehnt. Für das Extraparenchym ergibt sich eine Verschiebung der S-Phase um 4 Stunden.

4) Colchizin-Gruppe

Wird den Versuchstieren nur Colchizin verabreicht, so werden diese gleichmäßigen Mitosezahlen sehr deutlich. Das bei der 3-H-Thymidin-Gruppe festgestellte zirkardiane Rhythmusgeschehen ist vollkommen verschwunden.Es lassen sich bei der Mitosetätigkeit keine Maxima und Minima abgrenzen,sondern es kommt sowohl im Parenchymgewebe als auch im Extraparenchymgewebe zu einer Verteilung der Mitosetätigkeit auf sämtliche Tageszeiten bzw. zu einer Stagnation in der Metaphase. Lediglich für das

Extraparenchym ist ein Gipfel der Mitosetätigkeit um 12 h angezeigt, der aber nicht unbedingt Ausdruck sein muß für eine vermehrte Aktivität der Extraparenchymzellen.

Zusammenfassung:

Unter der Einwirkung des Colchizins ist eine zirkardiane Rhythmik nicht mehr feststellbar.

5) Lokalisation und Lobuli

Wie bereits festgestellt, ist eine Vermehrung der Zellzahl pro Gesichtsfeld einer Volumenverminderung der Einzelzelle gleichzusetzen. Da nun die Gesamtzellzahl pro Flächeneinheit im Lobulus um 24 h ihren Höhepunkt hat, kommt zum Ausdruck, daß es sich hierbei um das Minimum des Zellvolumens handelt. Dies ist in Übereinstimmung mit den bei der Betrachtung des 3-H-Thymidin-Index gefundenen Werten zu bringen, da sich dort ebenfalls um 24 h ein Minimum der Syntheseleistung zeigt. Es wird deutlich, daß bei kleinstem Zellvolumen keine Syntheseleistung der Zelle erfolgt. Während der übrigen Tageszeiten ist eine gleichbleibende Volumenerhöhung vorhanden. Die Lokalisation DNS-synthetisierender Zellen zeigt, daß sich Syntheseleistungen zu allen Tageszeiten vorwiegend im zentralen Bereich abspielen, mit einem Gipfelpunkt um 20 h. Da wir auch bei dem 3-H-Thymidin-Index eine Erhöhung der S-Phasen um 20 h gefunden haben, die wir als regeneratorische Eigentätigkeit des Organs bezeichnet haben, läßt sich annehmen, daß das Wachstum der Lobuli bevorzugt zentral erfolgt, d.h. in der Region der Vena centralis. Es handelt sich jedoch hierbei um ein qualitatives Wachstum (Ausbildung von Strukturen und Membranen), nicht um eine Zellvermehrung. Dies bestätigt sich auch bei der Lokalisation der Mitosen. Die relativen Zahlen zeigen in ihrer Gegenüberstellung, daß die Mitosetätigkeit im zentralen Bereich zu allen Tageszeiten gegenüber Intermediär sowie Peripher überwiegt.

Wie bei BUCHER angeführt ist, besteht in der Leberzelle von der Peripherie zur Vena centralis hin im Laufe des Tages ein Konzentrationsgefälle, hauptsächlich für die suspendierten Nahrungsstoffe, aber auch für Toxine und schädigende Noxen.

Wenn nun mit einer Änderung der Stoffkonzentration in der Zelle gleichzeitig eine Veränderung des Zellvolumens stattfindet, läßt sich aus den Volumenänderungen zu verschiedenen Tageszeiten auf die Richtung des Konzentrationsgefälles schließen. Es kann auf Grund der von uns gefundenen Werte gesagt werden, daß die peripheren Zellen um 12 h maximales Volumen besitzen, die intermediären Zellen ihr minimales Volumen, bis um 24 h aber eine Umkehr des Verhältnisses stattfindet. Das Konzentrationsgefälle besteht also von Peripher zu Zentral von 12-24 h, dann tritt eine gegenläufige Konzentrationsänderung in der Zelle auf.

Für den zentralen Bereich ergibt die Lokalisation der Mitosen die gleichen Maxima- und Minimawerte,wie bei der Betrachtung des entsprechenden Mitose-Index festgestellt.

Zusammenfassung:

Bei kleinstem Zellvolumen ist keine DNS-Syntheseleistung vorhanden. Vorhandene Syntheseleistungen sind zum Großteil zentral lokalisiert. Demnach geht das Wachstum von Zentral aus.

Da Zellvolumen und Konzentration von Zellinhaltsstoffen zueinander proportional sind, läßt sich auf ein Konzentrationsgefälle schließen von Peripher nach Zentral von 12-24 h, danach im umgekehrten Sinn.

Colchizin-Gruppe

Unter der Colchizinwirkung allein sind nur im intermediären Bereich vermehrt Mitosen zu finden.

Vergleichsgruppen (Abb. 12)

Bislang war die Frage ungeklärt, in welchem Maß die Injektion von 3-H-Thymidin DNS-Synthese und Mitosetätigkeit beeinflußt. Unsere Gegenüberstellung zeigt, daß die Mitose-Indizes bei den mit 3-H-Thymidin behandelten Tieren um das 9- bis 25fache höher sind als die der gleichgewichtigen Tiere derselben Altersstufe. Es ergibt sich daraus, daß das 3-H-Thymidin die Mitosen aktiviert. Weiterhin zeigt die Gegenüberstellung der Ergebnisse, daß ältere Tiere die Lebervergrößerung durch vermehrte Mitosetätigkeit erreichen.

D. Rhythmusversuch, generelle Zusammenfassung

Wenn man davon ausgeht, daß eine nahrungsphysiologisch bedingte Vergrößerung der Leberzellen stattfindet, so könnte das gefundene circardiane Maximum der Leberzellgröße morgens um 8 h mit der unmittelbar vorausgegangenen starken Nahrungsaufnahme in Zusammenhang gebracht werden. Markierung mit Thymidin sowie Mitosen finden sich zum Großteil Zentral. Von dort aus findet ein quantitatives Wachstum statt. Bei Colchizingabe zeigen sich Markierungen und Mitosen auch im intermediären Bereich vermehrt. Es besteht ein Konzentrationsgefälle von Peripher nach Zentral, 12-24 h, danach in umgekehrter Richtung.

Das Maximum der DNS-Syntheseperiode der Parenchymzellen dauert 4 Stunden, während das des Extraparenchyms nur 1 Stunde dauert. Die Mitosephase ist der S-Phase um 4 Stunden nachläufig. Eine späte S-Phase finden wir um 20 h. Bei kleinstem Zellvolumen erfolgt keine DNS-Synthese.

Unter der Einwirkung des Colchizins kommt es zu einer Anhäufung von Mitosen über einen Zeitraum von 6-8 Stunden. Die circardiane Rhythmik ist deshalb nicht mehr feststellbar. Für das Extraparenchym verschiebt sich das Maximum der S-Phase um 4 Stunden.

Im intermediären Bezirk des Läppchens häufen sich Mitosen besonders stark an.

Es ist nicht abgeklärt, welche Bedeutung die circardianen Schwankungen im Fett- und Glykogengehalt für die Zellvolumenänderung haben. Wie in der Dissertation NIESSING festgestellt, unterliegt der Gesamtfettgehalt ebenfalls einem circardianen Rhythmusgeschehen (Maximum 20 h bis 24 h, Minimum 6 h bis 10 h).

Daß der Glykogengehalt tagesrhythmischen Schwankungen unterliegt, wurde 1963 von SCHMID, SIESS, OEHMIG und KIRCHNER beschrieben. Die Versuche ergaben ein Maximum des Glykogengehalts für die Zeit von 24 h bis 8 h und einen weiteren kleinen Gipfel um 12 h. -

Denkt man an die mannigfaltigen Funktionen der Leberzelle, von denen heute 50-60 bekannt sind, lassen sich Volumenschwankungen sicher nicht allein auf Änderungen des Protein-, DNS- und RNS-Gehalts begrenzen.

IV. Versuchsergebnisse Langzeitversuch

A. Überblick über die histologischen Befunde

1) nach 18 Wochen langer Applikation der auf Seite 10ff darge= stellten Versuchsanordnung

Na_2HPo_4

Gleich den Kontrollen, keine wesentlichen Abweichungen

Phenobarbital

Im Läppchenzentrum Zellhypertrophie, vermehrt Leberzell- und Kernpolymorphie.

Halothan

Im Läppchenzentrum Zellhypertrophie, kleintropfige zentrale Verfettung, 1 benignes Hepatom, Leberparenchymnekrosen sowie Leberzell- und Kernpolymorphie.

Methoxyfluoran

Leberzellhypertrophie im Läppchenzentrum, ausgeprägte groß= tropfige Verfettung im Zentrum, Leberzell- und Kernpolymorphie.

Diäthylnitrosamin

Chronische, proliferierende Bindegewebsneubildung, Paren= chymnekrosen, überschießende Regeneratbildung, Pseudogallen= gangswucherungen, jedoch keine voll ausgebildete Cirrhose.

Diäthylnitrosamin + Phenobarbital

Leberzellhypertrophie im Zentrum, Leberzell- und Kernpoly= morphie, umschriebene Pseudogallengangswucherungen.

Diäthylnitrosamin + Phenobarbital + Halothan

Zentral Zellhypertrophie sowie polymorphe Zellen und Kerne.

Diäthylnitrosamin + Na_2HPo_4

Proliferierende Bindegewebsneubildung, Pseudogallengangs= wucherungen, starker Glykogenreichtum, Stadium der beginnenden Cirrhose.

Diäthylnitrosamin + Halothan

Parenchymnekrosen, intrahepatische Gefäßverschlüsse, überschießende Regeneratbildung, Umbau der Leberstruktur, polifelierende Bindegewebsneubildung. Schon zu diesem Zeitpunkt war eine Lebercirrhose ausgebildet.

Diäthylnitrosamin + Methoxyfluoran

In allen Lebern beginnende oder ausgebildete Cirrhose, teilweise Leberzellverfettung.

Die histologischen Präparate wurden von Dozent Dr. THOMAS, Pathologisches Institut der Universität Bonn, ausgewertet.

2) Histologische Befunde nach 30 Wochen

Phenobarbital

Ausgeprägte Zellhypertrophie im Zentrum, die Polymorphie hat zugenommen, Läppchenstruktur ist erhalten.

Halothan

Zentrale Leberverfettung, Parenchymnekrosen, Heterogenisierung des Cytoplasmas, Polymorphie, vermehrt Extraparenchymbildung.

Methoxyfluoran

Hypertrophie im Zentrum, ausgeprägte Extraparenchymproliferation, zentrale Verfettung, Polymorphie.

Na_2HPo_4

Gleich den Kontrolltieren keine wesentlichen Abweichungen.

Die Tiere der DÁNA-Gruppen waren zu diesem Zeitpunkt bereits tot.

B. Histometrische und autoradiographische Befunde

1) Vorbemerkung

Für die nachfolgenden Betrachtungen ist es notwendig, einige Bemerkungen über Wachstum, Hypertrophie und Hyperplasie vorauszuschicken. Der Begriff Wachstum umfaßt im engeren Sinne das embroynale, mit der Differenzierung einhergehende; das postnatale Größenwachstum der Organe und Organsysteme sowie das Tumorwachstum. Es handelt sich bei dem Organwachstum um eine Volumenzunahme durch Ansatz von Struktur und funktionell lebendiger Masse (KORB). Qualitative und quantitative Veränderungen von Einzelzellen sind dabei möglich. Nimmt nur die räumliche Dimension zu, ist das Wachstum quantitativ; ändert sich mit dem Grad der Differenzierung der Zellcharakter durch Ausbildung von cytoplasmatischen Strukturen, so liegt ein qualitatives Wachstum vor.

Erfolgt Wachstum durch Vergrößerung des Zellvolumens, sprechen wir von Hypertrophie. Findet es durch Zellvermehrung statt, von Hyperplasie.

Abgesehen von Wachstumsvorgängen mit Zellvermehrung spielen sich bis ins höchste Alter fortgesetzt Zellteilungen ab, die den regeneratorischen, physiologischen Bedarf decken. Jedoch sind nicht in allen postnatalen Zellen Wachstumspotenzen vorhanden. Wir kennen Gewebe mit labilen, nicht beständigen Zellen wie z.B. das Epithelgewebe, solche mit stabilen Zellen, die sich zur Durchführung einer Teilung entdifferenzieren müssen, sowie mit permanenten Zellen, wie z.B. das Nervengewebe. Die Wachstumspotenzen beschränken sich meist auf bestimmte Indifferenzzonen. In der Leber liegt sie in der intermediären Zone des Leberläppchens (BÜCHNER). Jede Leberparenchymzelle hat aber darüber hinaus die Fähigkeit, sich auch im reifen Organismus mitotisch und amitotisch teilen zu können.

Untersuchungen an Rattenlebern nach Teilhepatektomie (ÖHLERT, HÄMMERLING, BÜCHNER) haben ergeben, daß die Regeneration mit den Zellen beginnt, die durch eine gesteigerte Syntheseleistung, Verlust cytoplasmatischer Proteine, Abbau cytoplasmatischer Strukturen, also einer Entdifferenzierung charakterisiert sind.

Mit diesem Verlust von Strukturen und Protein entfällt deren Hemmwirkung auf die DNS-Synthese; die postmitotische Zelle wird zu einer entdifferenzierten intermitotischen Zelle, die die Fähigkeit zur DNS-Synthese wiedererlangt. Die Entdifferenzierung beginnt in der Peripherie und schreitet zum Läppchenzentrum hin fort. Nach Mitoseschüben und nach Erreichen der ursprünglichen Zellzahl normalisiert sich die Syntheseleistung der Einzelzelle. Die reversibel postmitotische Leberparenchymzelle gewinnt also in dem Maße die Fähigkeit zur DNS-Synthese zurück, in dem sie ihre cytoplasmatische Differenzierung verliert. Mit Zunahme der Differenzierung cytoplasmatischer Strukturen nimmt die DNS-Synthese im Leberparenchym wieder ab. Hieraus erklärt sich die prospektive Bedeutung der Indifferenzzone für das hyperplastische, regeneratorische und carzinogene Wachstum.

Die Wirkungsweise des von uns verwendeten Carzinogens Diäthylnitrosamin läuft nach BÜCHNER folgendermaßen ab: Die Canzerogene greifen in die S-Phase ein, indem sie am geformten Ergastoplasma Proteine und spezifische RNS zerstören. Diese jedoch sind die physiologischen Regler der DNS-Synthese. Das irreversible Fehlen der Proteine und RNS nach genügend langer Dosis-Zeit-Einwirkung der Canzerogene regt an den Chromosomen die DNS-Verdopplung an, mit den folgenden mitotischen und endomitotischen Zellteilungen. Die nicht mehr gehemmte DNS-Verdoppelung führt zur gesteigerten Bildung von RNS und Protein, unter Verzicht auf Differenzierung. Diese Zellvermehrung, von den Zellen der Indifferenzzone ausgehend, bewirkt das invasive carzinomatöse Wachstum.

Zur Beurteilung der Wachstumsvorgänge, die sich unter dem Einfluß der Pharmaka zeigen, war es zweckmäßig, aus den ermittelten Daten drei Verhältnisse zu berechnen.

1. Verhältnis Parenchymzellzahl zu rel. Lebergewicht
2. Verhältnis Extraparenchymzellzahl zu rel. Lebergewicht
3. Verhältnis Parenchymzellzahl zu Extraparenchymzellzahl.

(Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet: Verh.I ist P/L, Verh.2 ist E/L, Verh.3 ist P/E.)

Daraus ergeben sich Aussagemöglichkeiten über das Maß
1. der Hypertrophie,
2. der Hyperplasie, über
3. eventuell vorliegende Mischformen und
4. über Vorkommen von Bindegewebsvermehrung.

Wird das rel. Lebergewicht größer, die Zellzahl pro Gesichtsfeld kleiner, so liegen hypertrophische Veränderungen vor. Nimmt bei gleichbleibender Parenchymzellzahl pro Gesichtsfeld das rel. Lebergewicht zu, handelt es sich um ein hyperplastisches Wachstum. Dazu folgende Rechnung:

Zu Beginn sei die Zellzahl pro Gesichtsfeld 100, das rel. Lebergewicht ebenfalls 100. Es ergibt sich daraus ein Faktor von 1:1. Verdoppelt sich das rel. Lebergewicht und verringert sich die Zellzahl um die Hälfte, so liegt rein hypertrophisches Wachstum vor, es ergibt für Verh.1 der Faktor von 1:4. Das gleiche Rechenbeispiel läßt sich für die Hyperplasie durchführen. Auch hier sei zu Beginn die Zellzahl 100, das rel. Lebergewicht 100. Bleibt die Parenchymzellzahl pro Gesichtsfeld gleich, bei doppeltem rel. Lebergewicht, errechnet sich für die reine Hyperplasie ein Faktor von 1:0,5.
Auch wenn sich die Veränderungen von Zellzahl und rel.Lebergewicht in der räumlichen, also 3. Dimension abspielen, gibt diese auf Grund von Flächenmessungen durchgeführte Berechnung eine gute Orientierung. Hyperplasie und Hypertrophie sind zwei einander entgegengesetzt verlaufende Prozesse, sie können jedoch im gleichen Organ zur gleichen Zeit nebeneinander zu finden sein.

Atrophische Vorgänge spielen in der Leber für die von uns angesetzte Versuchsdauer von 30 Wochen eine untergeordnete Rolle und brauchen nicht berücksichtigt zu werden.

2) Analyse der Versuchsergebnisse

a) 18 Wochen (Abb. 13 und 14)

Kontrollen

P/L = 1:3,5	E/L = 1:4,4	P/E = 56:44%
3-H-Thymidin-Ind.Par. = 0,03		Extrap. = 0,19
rel. Lebendgewicht = 50mg/g		

Bei den 18 Wochen-Normaltieren sind die Wachstumsvorgänge an der Leber des Normaltieres als im physiologischen Gleichge= wicht zu betrachten. Für die nachfolgenden Betrachtungen über die Leberveränderungen unter dem Einfluß der Pharmaka bilden die an ihnen erhobenen Kontrollwerte die Grundlage.

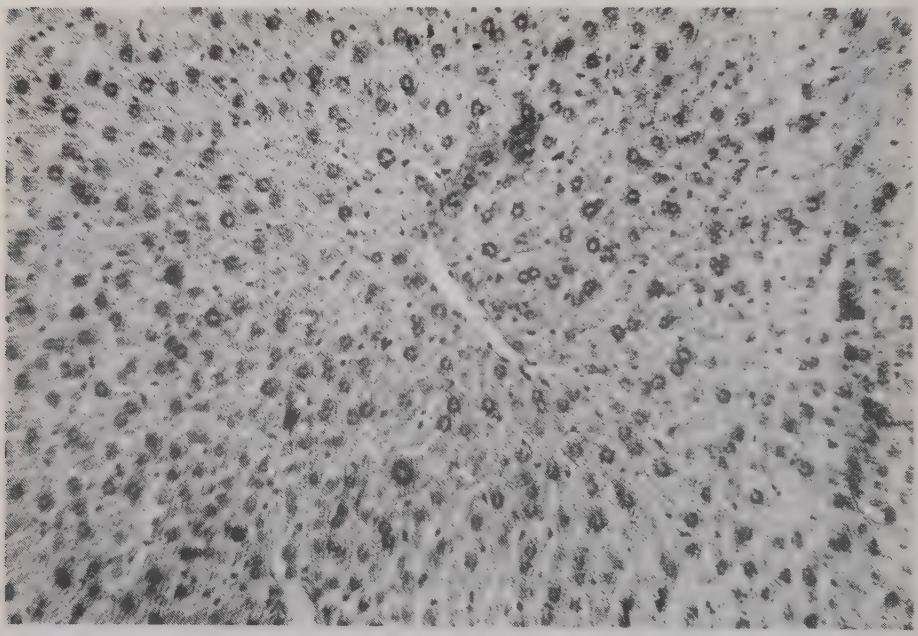

Abb. 13: Leber der Kontrolltiere nach 30 Wochen, Übersichtsaufnahme. Okular 10x. Objektiv 10x

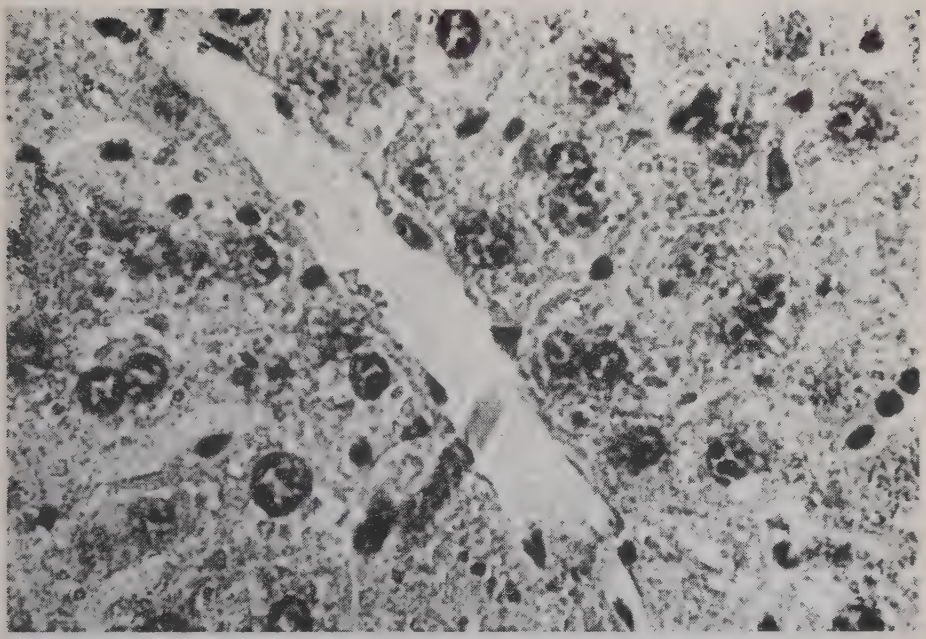

Abb. 14: Leber der Kontrolltiere nach 30 Wochen, Zentraler Bereich. Okular 10x. Objektiv 40x.

Na_2HPo_4

P/L = 1:3,4 E/L = 1:4 P/E = 54:46 %
3-H-Thym.-Ind.Par. = 0,05 Extrap. = 0,17
rel. Lebergewicht = 50,3 mg/g

Gegenüber den Kontrollen ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. Der 3-H-Thymidin-Index liegt im Streubereich der Kontrollen.

Phenobarbital

P/L = 1:9,2 E/L = 1:8,8 P/E = 48:52 %
3-H-Thym.-Ind.Par. 0,15 Extrap. = 0,26
rel. Lebergewicht = 82,0 mg/g

Phenobarbital führt zu einer vorwiegenden Hypertrophie des Parenchyms und des Extraparenchyms. Das Verhältnis der Divi=

soren ist nur 2,7 anstatt wie im Extremfall 4.
Im histologischen Bild ist die Zellhypertrophie (Verringerung der Parenchym- und Extraparenchymzellzahl) vor allem zentral festzustellen; in der Peripherie ist die Zellgröße normal.
Da die Thymidin-Indizes gegenüber den Kontrollen nicht signifikant verändert sind, ergibt sich, daß bezüglich des DNS-Umsatzes ein Steady state besteht, obwohl Phenobarbital weiterhin metabolisiert wird und damit eine erhöhte Zelleistung vorhanden ist. Zudem führt das Vorhandensein spezifischer Pharmakametaboliten zu einer Neusynthese von Enzymen.

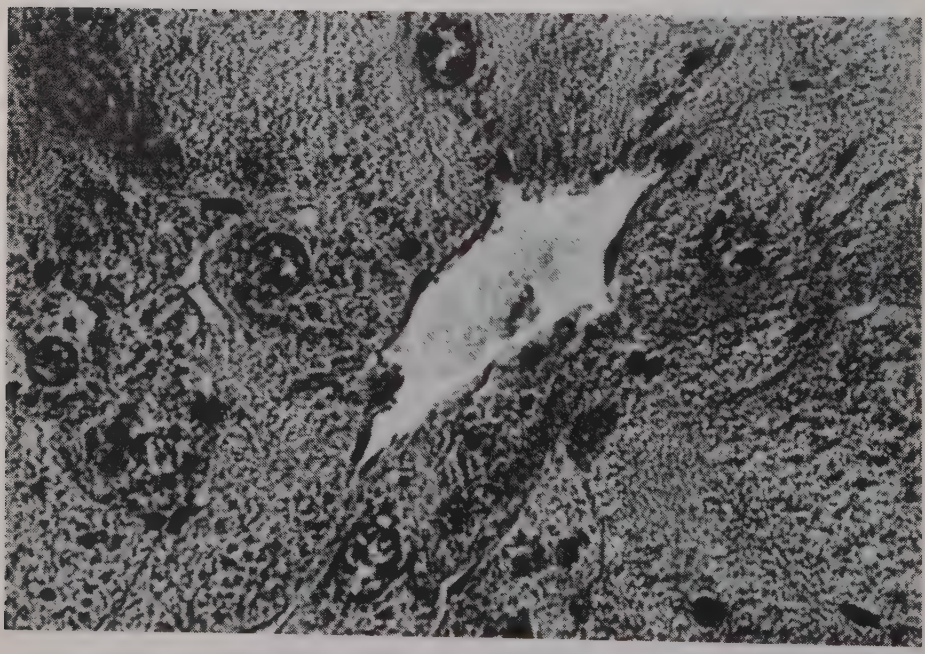

Abb. 15: Leber nach 18wöchiger Applikation von Phenobarbital, Zentraler Bereich. Okular 10x. Objektiv 40x.

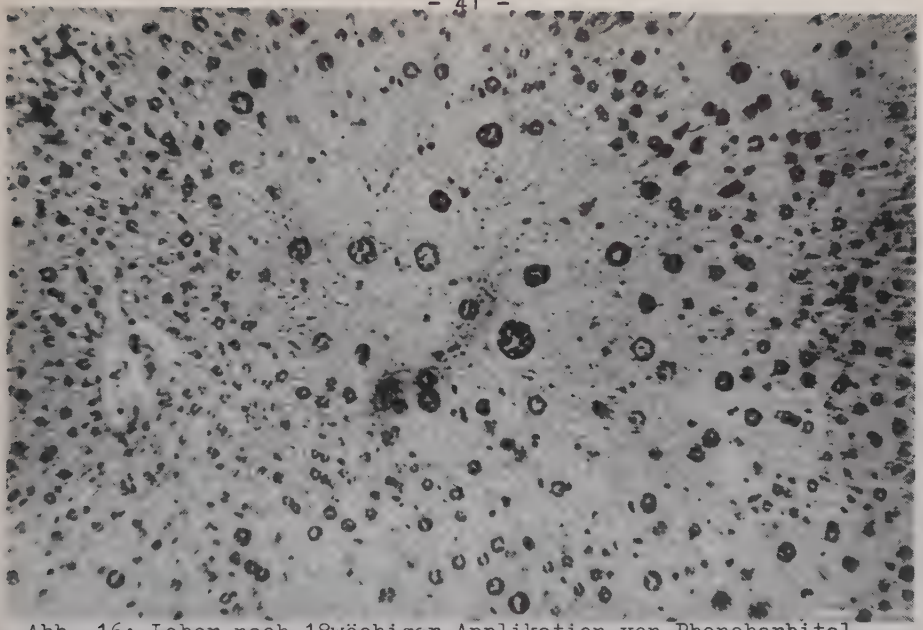

Abb. 16: Leber nach 18wöchiger Applikation von Phenobarbital, Übersicht. Okular 10x. Objektiv 10x.

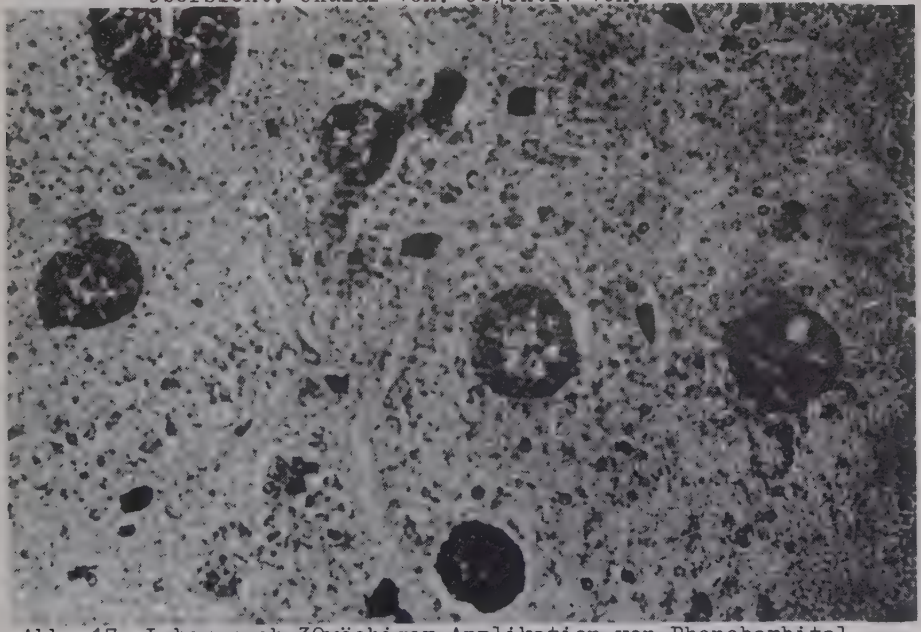

Abb. 17: Leber nach 30wöchiger Applikation von Phenobarbital, Zentraler Bereich. Okular 10x. Objektiv 40x.

Halothan

P/L = 1:7,3 E/L = 1:5 P/E = 40:60%
3-H-Thym.-Ind.Par. = 0,06 Extrap. = 0,12
rel. Lebergewicht = 70,3 mg/g
Verhältnis der Divisoren = 2,1

Halothan führt im Parenchym zu einer teilweisen Hypertrophie. Sie ist nicht so stark ausgeprägt wie bei den Phenobarbitalle= bern und beschränkt sich im wesentlichen auf den zentralen Be= reich des Läppchens. Das Extraparenchym zeigt eine geringe hyperplastische Tendenz sowie geringe Hypertrophie. Die zentra= le Hypertrophie des Läppchens ist auch hier wiederum aus der Verringerung der Parenchymzellzahl und dem erhöhten Lebergewicht ersichtlich. Gegenüber dem Phenobarbital kommt hier eine peri= phere Extraparenchymvermehrung hinzu. Die im histologischen Bild sichtbaren degenerativen Veränderungen sind wahrscheinlich auf die pharmakabedingte Stoffwechselwirkung zurückzuführen. Ein Vergleich der Indizes zeigt, daß die DNS-Synthese nicht signifikant von den Kontrollen abweicht; die Verhältnisse bei der Zellvermehrung sind also stabil wie bei den Kontrollen.

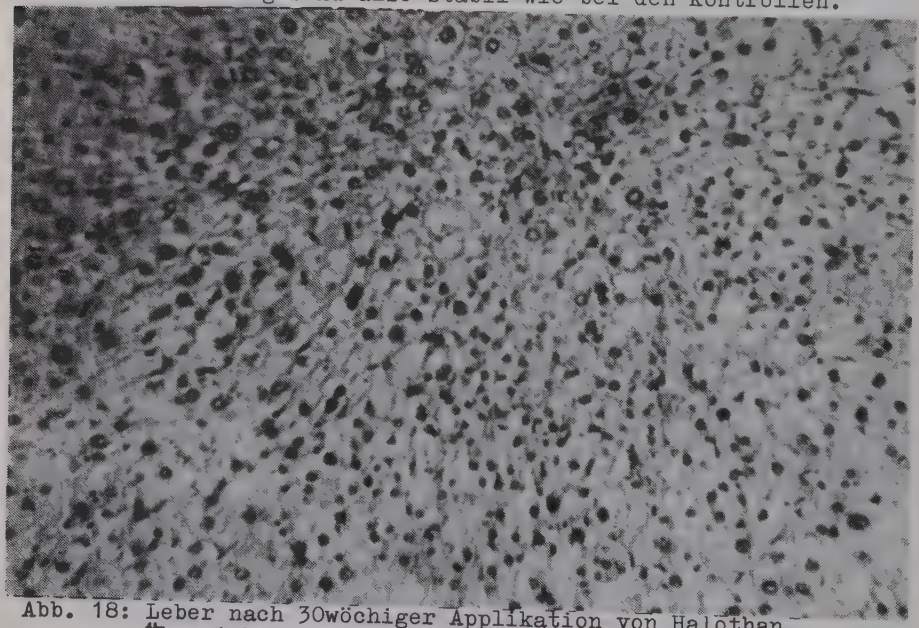

Abb. 18: Leber nach 30wöchiger Applikation von Halothan, Übersicht. Okular 10x. Objektiv 10x.

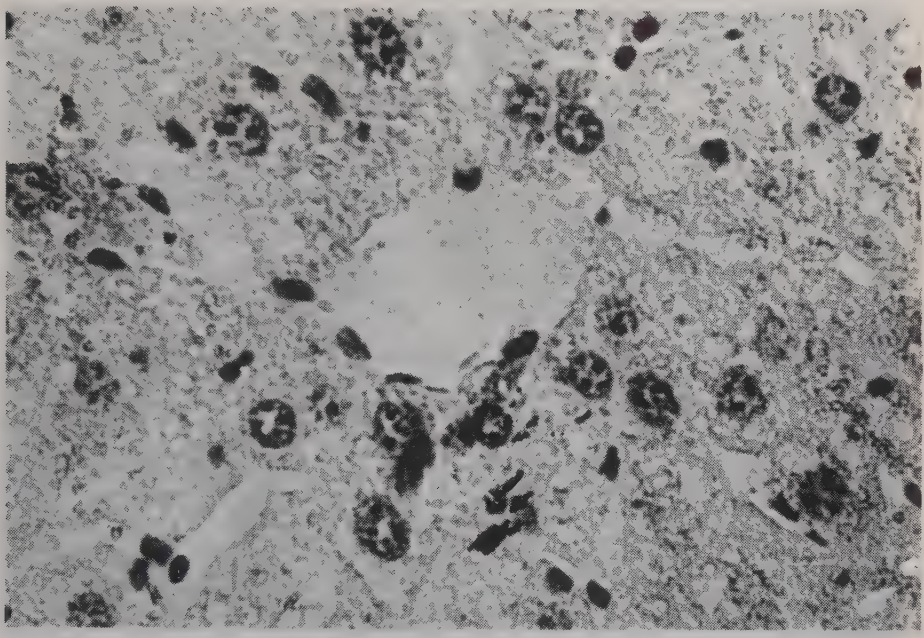

Abb. 19: Leber nach 30wöchiger Applikation von Halothan, Zentraler Bereich. Okular 10x. Objektiv 40x.

Methoxyfluoran

P/L = 1:7,8 E/L = 1:1,3 P/E = 14:86%
3-H-Thym.-Ind.Par. = 0,84 Extrapar. = 0,14
rel. Lebergewicht = 71,3 mg/g
Verhältnis der Divisoren = 2,2

Methoxyfluoran erzeugt im Parenchymgewebe eine teilweise Hypertrophie, im Extraparenchymgewebe eine reine Hyperplasie. Gegenüber dem Halothan hat das Methoxyfluoran eine weitaus stärkere Wirkung auf die Struktur der Läppchen. Die geringe Parenchymzellzahl ist wiederum kennzeichnend für die zentrale Hypertrophie. Auffallend ist eine feinseptale Fibrose; sie ist gegenüber Halothan um das 4fache vermehrt, bei gleichem Lebergewicht. Es ist bekannt, daß die wenig differenzierten Gewebe prospektive Potenzen besitzen, die bei einer Weiterdifferenzierung wegfallen. Unter besonderen

Umständen können sich diese 'Fähigkeiten' entfalten, wie es bei der Gabe von Methoxyfluoran der Fall zu sein scheint. Es zeigen sich außerdem im Cytoplasma der zentral gelegenen Zellen degenerative Prozesse. Der 3-H-Thymidin-Index des Parenchyms ist gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Diese signifikante Erhöhung der DNS-Synthese dürfte als Folge des Methoxyfluoranmetabolismus gedeutet werden. Ob auch die Proliferation des Extraparenchyms direkt damit zusammenhängt, muß offen bleiben.

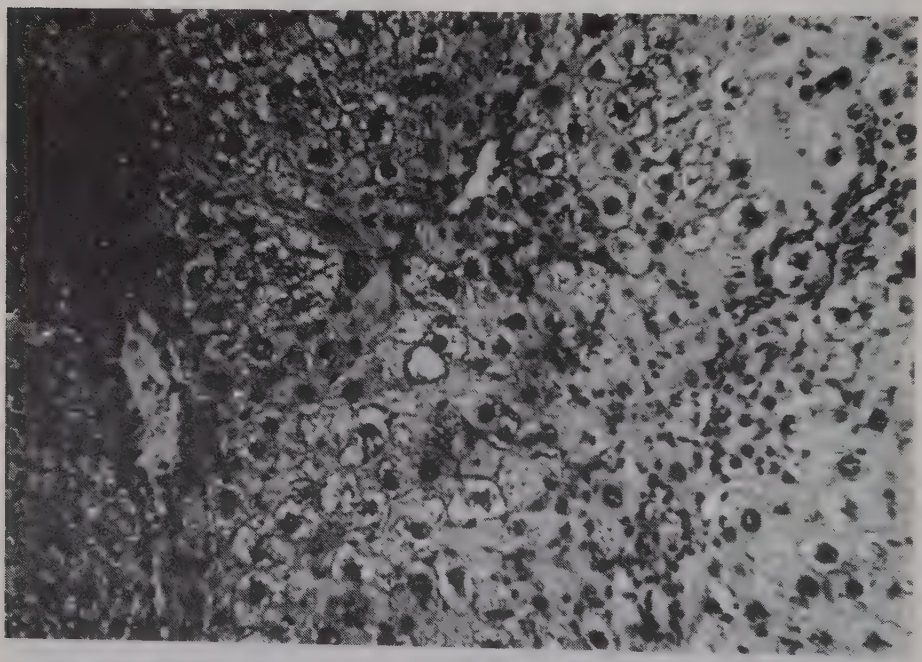

Abb. 20: Leber nach 18wöchiger Applikation von Methoxyfluoran, Übersicht. Okular 10x. Objektiv 10x.

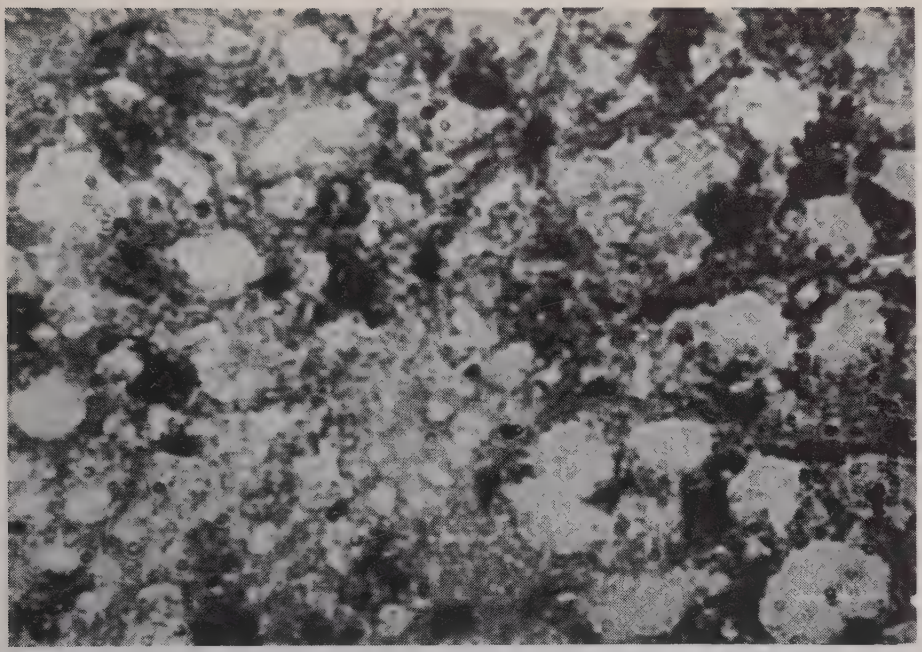

Abb. 21: Leber nach 30wöchiger Applikation von Methoxyfluoran, Stadium der Verfettung. Okular 10x. Objektiv 40x.

Diäthylnitrosamin

P/L = 1:5,1 E/L = 1:1 P/E = 17:83%
3-H-Thym.-Ind.Par. = 1,69 Extrap. = 0,30
rel. Lebergewicht = 81,5 mg/g
Verhältnis der Divisoren = 1,8

Diäthylnitrosamin erzeugt im Parenchymgewebe Cirrhosen mit hyperplastischen Gallengangswucherungen.
Das als sicheres Carzinogen bekannte DÄNA führte in unserem Versuch bei allen Tieren zu beginnenden oder ausgeprägten Lebercirrhosen, z.T. mit Parenchymnekrosen. Das relative Lebergewicht ist verringert. Lichtmikroskopisch erfaßbare Veränderungen am Cytoplasma (Fehlen von Strukturen und kleindisperse Verteilung des Cytoplasmas) der zentralen Parenchymzellen zeigen, daß es sich bei der Hypertrophie um ein Einströmen

von Flüssigkeiten handelt; es bietet sich das Bild der wäßrigen Desintegration ausgedehnter Areale (BÜCHNER). Die vermehrte DNS-Synthese wird in unserem Versuch durch den 50fach signifikant erhöhten 3-H-Thymidin-Index bestätigt. Dies ist ein deutliches Zeichen für die Steigerung von Zellteilungsvorgängen. Diese Teilungsvorgänge und DNS-Synthesen sind vorwiegend zentral zu finden; gegenüber dem Normaltier ist die zentrale Aktivität etwa verdoppelt. Auch Intermediär sind die markierten Zellen vermehrt, während Peripher fast keine Aktivität zu registrieren ist. Für das Dimethylnitrosamin ist erwiesen, daß es zu der Fehlbildung und Vermehrung der DNS- und RNS-Produktion führt, indem es die Purinbasen an freien Valenzen methyliert, ebenso die freien H-Valenzen der Aminosäure methyliert. So wird z.B. die Base Guanin in Methylguanin übergeführt. Diskutiert wird der gleiche Vorgang für das DÄNA, wobei an den freien H-Valenzen eine Äthylierung stattfindet. Ob dies eine ausschlaggebende Rolle für die ansteigende Syntheseleistung spielt, muß offen bleiben. Nach den von uns gefundenen Werten ist dies nicht auszuschließen, da auch die DÄNA-Kombinationen hohe 3-H-Thymidin-Indizes zeigen. Lediglich das Phenobarbital reduziert die Syntheseleistung und verzögert die Entstehung der Carzinome. Da bei der Carzinomentstehung eine deutliche Dosis-Zeit-Prägnanz vorhanden ist, ist es denkbar, daß das Phenobarbital durch erhöhten Abbau zu einer zunächst unterschwelligen DÄNA-Dosis führt. Wie die Arbeiten von PREUSSMANN und Mitarbeitern gezeigt haben, spielt die Alkylierung von Nukleinsäuren für den Mechanismus der carzinogenen und mutagenen Wirkung der Nitrosamine die ausschlaggebende Rolle. Die "drug metabolizing enzymes" führen den Abbau der Nitrosamine durch, und es entsteht ein Diazoalkan, das als starkes Alkylierungsmittel bekannt ist. Diazoalkan zerfällt im sauren Milieu über das Diazonium-Salz unter Abspaltung von Stickstoff in ein Carbonium-Ion, das eigentliche alkylierende Agens.

Eine zweite Theorie (Hermann SCHMID) führt die carzinogene Wirkung auf eine Polarisierung der Moleküle zurück. Krebshemmende Stoffe, die Dipole oder positive Ionen sind, treten in Konkurrenz um die polaren Molekeln der Zelle mit den canzero-

genen Stoffen. Solche Dipole können in den Zellsubstanzen als Enzym vorhanden sein. Diese Enzyme konkurrieren dann mit der DNS und RNS um die carzinogenen Substanzen, wirken also auf die Carzinogenese hemmend. Ist in den Mikrosomen die Enzympro= duktion gesteigert, kann allein aus Gründen der Dipolarität bzw. der positiven Ionisation und der elektrostatischen Bin= dungskräfte ein Carzinogen in seiner Wirkung unterdrückt oder gehemmt werden.

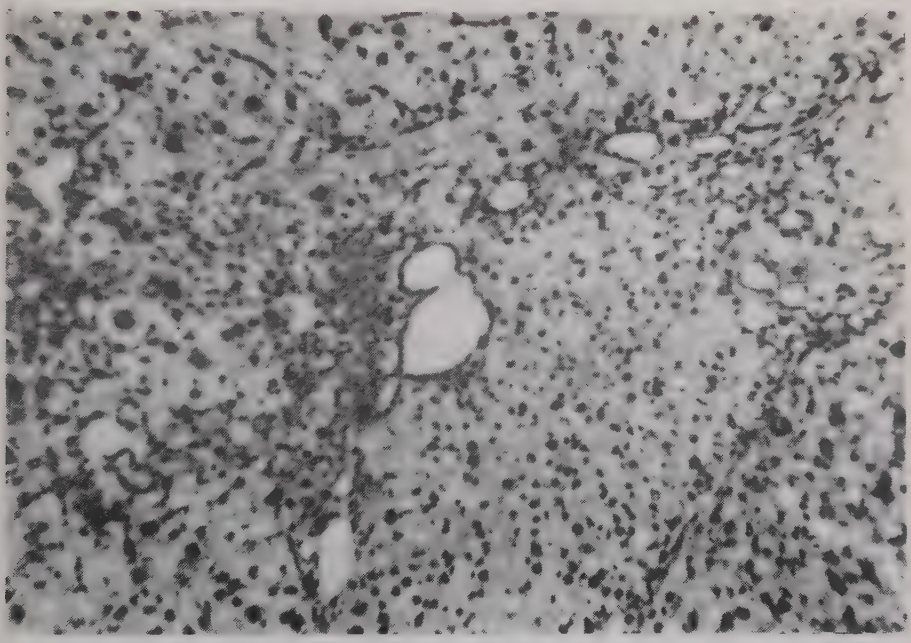

Abb. 22: Leber nach 18wöchiger Applikation von DÄNA, Übersicht Okular 10x. Objektiv 10x.

Diäthylnitrosamin + Na_2HPo_4

P/L = 1:5,1 E/L = 1:1 P/E = 19:81%
e-H-Thym.-Ind.Par. = 1,10 Extrap. = 0,25
rel. Lebergewicht = 102,5 mg/g
Verhältnis der Divisoren = 1,8

Gegenüber der Reinsubstanz DÄNA ist keine signifikante Verän= derung feststellbar.

Diäthylnitrosamin + Halothan

P/L = 1:4,7 E/L = 1:1,4 P/E = 23:77%
3-H-Thym.-Ind.Par. = 0,33 Extrap. = 0,17
rel. Lebergewicht = 133,8 mg/g
Verhältnis der Divisoren = 1,3

Bemerkenswert ist die verminderte zentrale Hypertrophie bei gleichzeitigem Anstieg des rel. Lebergewichts. Neben den hypertrophischen Vorgängen spielt jetzt hyperplastische Zellvermehrung eine größere Rolle. Der 3-H-Thymidin-Index ist niedrig. Halothan reduziert also die durch DÄNA induzierte DNS-Synthese und setzt die Zahl der DNS-bildenden Parenchymzellen herab.

Diäthylnitrosamin + Methoxyfluoran

P/L = 1:5 E:L = 1:1,6 P/E = 23:77%
3-H-Thym.-Ind.Par. = 0,82 Extrap. = 0,27
rel. Lebergewicht = 169,6 mg/g
Verhältnis der Divisoren = 1,5

Zellzahlen pro Gesichtsfeld und rel. Lebergewicht nehmen zu, d.h. verminderte Hypertrophie, vermehrte Hyperplasie. Übereinstimmend damit ist auch der 3-H-Thymidin-Index größer als bei Methoxyfluoran und kaum größer als bei DÄNA allein. Wie sich während des Versuchsverlaufs gezeigt hat, hemmt das Methoxyfluoran die carzinogene Wirkung des DÄNA nur wenig, wobei die ausgeprägte Extraparenchymproliferation unvermindert anhält. Normalerweise hätte man erwartet, daß sich die hyperplastischen Wirkungen der beiden Substanzen addieren. Dies ist aber nicht der Fall. Vielleicht ist die Extraparenchymbildung in der Leber begrenzt, so daß ein bestimmtes Höchstmaß der Proliferation nicht überschritten werden kann.

Diäthylnitrosamin + Phenobarbital

P/L = 1:4,8 E/L = 1:4,2 E/P = 44:56%
3-H-Thym.-Ind.Par. = 0,09 Extrap. = 0,54
rel. Lebergewicht = 95,7 mg/g
Verhältnis der Divisoren = 1,4

Außer einer geringen, umschriebenen Extraparenchymproliferation sowie einer geringen, nicht signifikanten Zunahme der Zellzahlen pro Gesichtsfeld, entsprechend einem Rückgang der Hypertrophie, hat sich gegenüber der Reinsubstanz Phenobarbital nichts geändert. Diese Befunde sind sehr bemerkenswert. Es ist daraus zu schließen, daß das Phenobarbital die carzinogene Wirkung des DÄNA auf ein Minimum beschränkt. Da zudem das rel. Lebergewicht abgenommen hat, muß unter der Einwirkung des DÄNA die Hypertrophie im Zentrum rückläufig geworden sein und das Phenobarbital die Diäthylnitrosamin-bedingte Hyperplasie des Extraparenchyms reduziert haben. Der 3-H-Thym.-Index liegt im Streubereich der Kontrollen. Das kann bedeuten, daß das DÄNA, bevor es stoffwechselaktiv werden kann, von dem Phenobarbital entgiftet wird. Damit würde übereinstimmen, daß die carzinogene Wirkung von DÄNA von den applizierten Dosen abhängig ist. (DRUCKREY wie in Diss. MICHEL)

Diäthylnitrosamin + Phenobarbital + Halothan

P/L = 1:8,7 E/L = 1:8,9 E/P = 51:49%
3-H-Thym.-Ind.Par. = 0,39 Extrap. = 0,60
rel. Lebergewicht: 113,1 mg/g
Verhältnis der Divisoren: 2,2

Das rel. Lebergewicht und der 3-H-Thym.-Index sind gegenüber DÄNA-Phenobarbital erhöht. Hypertrophische Vorgänge scheinen von hyperplastischen überlagert zu sein, da die Veränderungen der Zellzahlen gegenüber den reinen Phenobarbital- und Halothansubstanzen nicht signifikant sind.

b. 30 Wochen

Die Tiere der DÄNA-Gruppe und der DÄNA-Kombinationen waren zu diesem Zeitpunkt bereits tot. Die Todesursachen sowie die Veränderungen der verschiedenen Organe, die Lokalisation der ausgebildeten Tumoren sowie die Ursachen der Spontantodesfälle sind in der Dissertation MICHEL tabellarisch festgehalten. Na_2HPo_4, Phenobarbital, Halothan und Methoxyfluoran führen für

sich allein auch nach 30wöchiger Applikation zu keiner weiteren signifikanten Veränderung des Zustandes, der bereits nach 18 Wochen vorhanden war. Es zeigt sich lediglich bei der Betrachtung der 3-H-Thymidin-Indizes für alle Substanzen eine verminderte Syntheseleistung, die entweder auf eine Normalisierung der Stoffwechseltätigkeit oder aber auf eine Erschöpfung der regeneratorischen Leistungen und Enzymsynthetisierung zurückzuführen ist.

c. Lokalisation und Indizes nach 18 und 30 Wochen (Abb. 25)

Nach 18 Wochen sind die Indizes der Gruppen DÄNA, Halothan, Methoxyfluoran, DÄNA-Halothan, DÄNA-Phenobarbital-Halothan und DÄNA-Methoxyfluoran gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Nach 30 Wochen läßt sich für die Gruppen auf Grund der großen Streuungen eine gesicherte Signifikanz nicht mehr errechnen, jedoch ist der Wert des Methoxyfluoran als gültig zu betrachten, da er die Kontrollen um das 10fache übersteigt.

Der 3-H-Thym.-Ind. des Extraparenchyms übersteigt die Kontrollen nur bei den Gruppen DÄNA-Phenobarbital und DÄNA-Phenobarbital-Halothan. Nach 30 Wochen sind die Indizes annähernd gleichgroß, jedenfalls nicht mehr signifikant unterschieden. Eine statistisch gesicherte Signifikanz ließ sich nur für die Gruppe DPhH nach 18 Wochen errechnen. Alle anderen Indizes des Extraparenchyms für 18 und 30 Wochen sind nicht signifikant verändert gegenüber den Kontrollen.

(Abb. 26) Die Gegenüberstellung der quantitativen Verteilung der Parenchymzellen auf die einzelnen Zonen im Leberläppchen ergibt, daß sich an der Relation von zentraler, intermediärer und peripherer Zellzahl auch unter der Einwirkung der verschiedenen Fremdstoffe nichts ändert. Die Abweichungen liegen im Streuchbereich der Kontrollen.

(Abb. 26) Bei der Lokalisation der 3-H-Thymidin-markierten Zellen ergab sich statistisch gesehen folgendes Bild:

Sie waren im zentralen Bereich nach 18 Wochen bei allen Substanzgruppen und ihren Kombinationen gegenüber den Kontrollen erhöht. In der Intermediärzone sind DPhH, DPh, DÄNA und

Methoxyfluoran signifikant erhöht, peripher ergab sich eine negative Signifikanz für DÄNA, Phenobarbital, Na_2HPo_4 und Halothan. Nach 30 Wochen zeigten sich über alle Bereiche hinweg keine signifikanten Unterschiede mehr.

Alle Substanzen rufen also nach 18 Wochen Applikation im zentralen Bereich eine vermehrte DNS-Synthese hervor. Es muß also bei allen Substanzen eine mehr oder minder ausgeprägte Hypertrophie vorhanden sein, die sich bei den Gruppen DPhH, DPh, DÄNA sowie Methoxyfluoran auch auf den intermediären Bereich ausdehnt. Daraus ist ersichtlich, daß Metaboliten hauptsächlich Zentral wirksam sind, der intermediäre Bereich erst bei einer Überbeanspruchung in die Synthetisierung spezifischer Enzyme mit einbezogen wird.

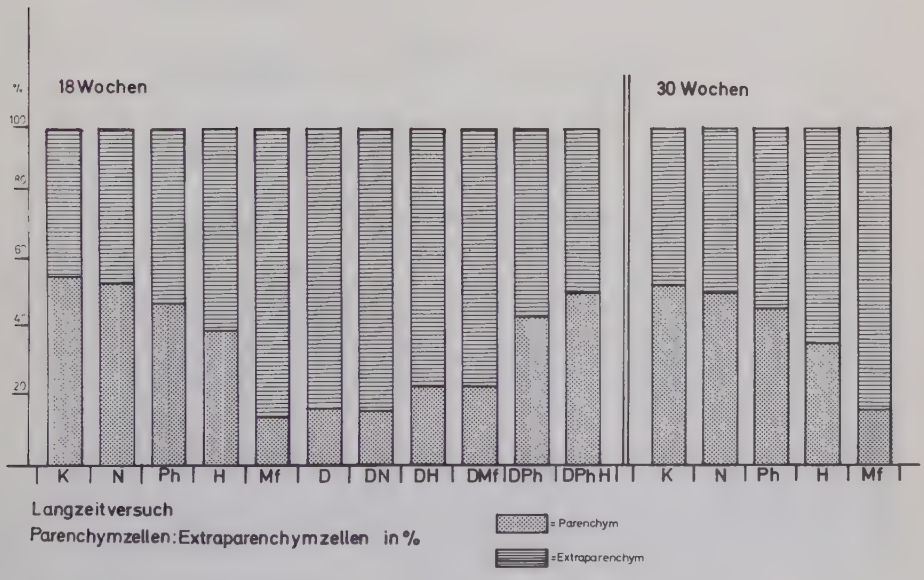

Abb. 23

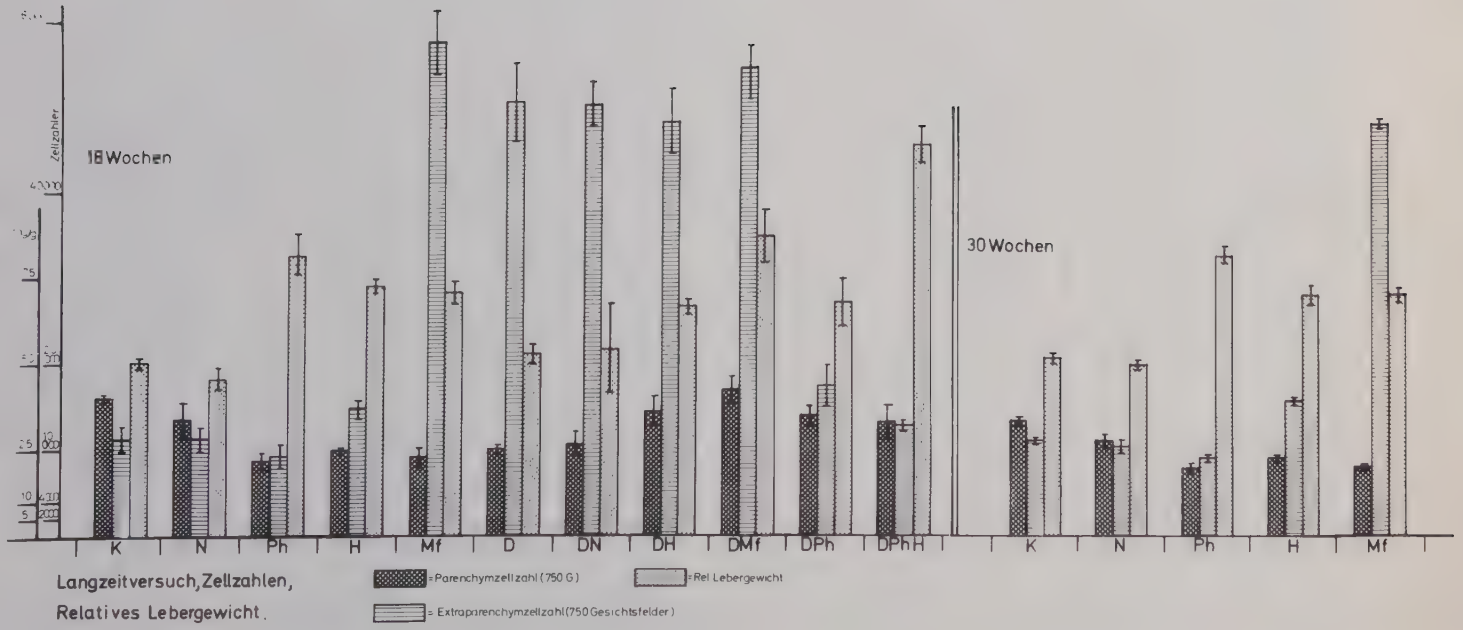
Zellzahlen
18 Wochen
30 Wochen
K
N
Ph
H
Mf
D
DN
DH
DMf
DPh
DPhH
K
N
Ph
H
Mf
Langzeitversuch, Zellzahlen,
Relatives Lebergewicht.
= Parenchymzellzahl (750 G)
= Rel Lebergewicht
= Extraparenchymzellzahl (750 Gesichtsfelder)

Abb. 24

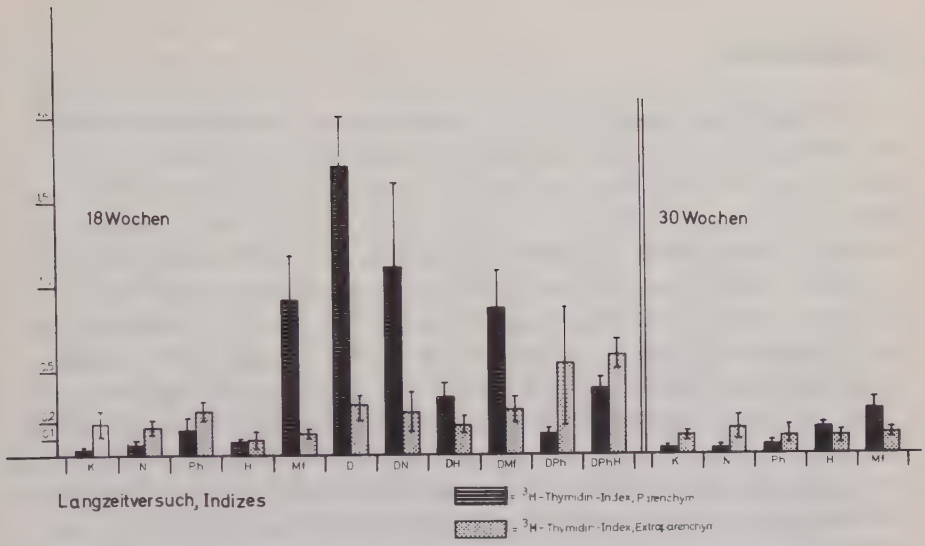
18 Wochen
30 Wochen
K
N
Ph
H
Mf
D
DN
DH
DMf
DPh
DPhH
Langzeitversuch, Indizes
= ³H-Thymidin-Index, Parenchym
= ³H-Thymidin-Index, Extraparenchym

Abb. 25

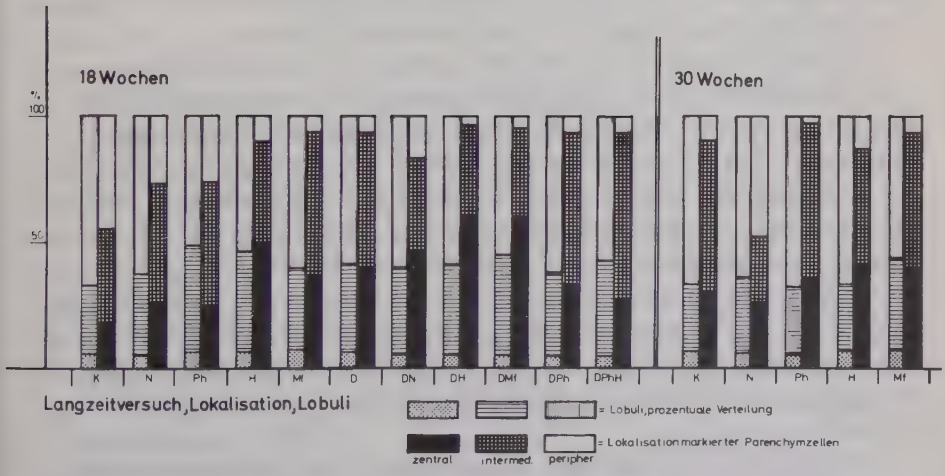
18 Wochen
30 Wochen
%
100
50
K
N
Ph
H
Mf
D
DN
DH
DMf
DPh
DPhH
Langzeitversuch, Lokalisation, Lobuli
= Lobuli, prozentuale Verteilung
= Lokalisation markierter Parenchymzellen
zentral
intermed.
peripher

Abb. 26

V. Diskussion

In Übereinstimmung mit vorausgegangenen Untersuchungen wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine tagesrhythmische Schwankung von DNS-Synthese und Mitosen für die Leber der Maus gefunden. Solche tagesrhythmischen Schwankungen von Lebensprozessen haben die Forschung immer wieder beschäftigt.

Eine cirkardiane Periodik, Schwingungsprozesse an die alles irdische Leben gebunden ist, läßt sich bei vielen Lebewesen der verschiedensten Arten nachweisen. Der deutsche Physiologe Emil DU BOIS-REYMOND sagt über den Zeitsinn, er sei eigentlich ein vergröbertes Gehör und Gesicht, da das innere Ohr und die Netzhaut auch nichts anderes tun als die schnellere Folge von Impulsen zu unterscheiden. Selbst nach Zerstörung des Nervensystems ist die Tagesperiodik nachweisbar, so daß der eigentliche Grundrhythmus in jeder Körperzelle vorhanden sein muß. Einen Zusammenhang zwischen rhythmischen Veränderungen des Zellvolumens und der Aktivität der Gene fand RENSING. Kurze Zeit nach der tagesperiodischen Ausschüttung des Häutungshormons "Ecdyson" erscheinen an bestimmten Stellen der Riesenchromosomen der Drosophila melanogaster Reaktionszentren, die die Synthese der Eiweißkörper steuern (SEIDEL).

BÜNNING hat aus der hemmenden Wirkung von Aktinomycin D auf die Rhythmik auf eine DNS-abhängige RNS-Synthese geschlossen. Die endogen tagesperiodischen Volumenschwankungen der Zellkerne, die Polyploidierung, weisen auf deren Mitwirkung bei der Rhythmik hin. Allerdings läuft die Rhythmik auch ohne Zellkern weiter. Wird die Energiezufuhr durch Temperaturänderungen oder Atmungsgifte zu verschiedenen Phasen des Zyklus herabgedrückt, so zeigen sich Phasenverschiebungen unterschiedlicher Art. Untersuchungen mit Veränderungen der Lichtzufuhr zeigen eine deutliche Abhängigkeit vom Sonnenauf- und -untergang, der Jahreszeit, der Wellenlänge des Lichts und der Intensität.

Der cirkardiane Rhythmus bedingt nicht nur Größenschwankungen der Zellkerne, sondern auch das Karyogramm, d.h. die relative Häufigkeit der verschiedenen Zustandsformen: mitotische

Kerne, Großkerne, Doppelkerne usw. werden beeinflußt. Die statistische Analyse der Korrelationen zwischen verschiedenen Kernformen führten zu der Auffassung, daß während der Nacht eine bestimmte Anzahl von Großkernen sich amitotisch teilt, wodurch die Häufigkeit der Doppelkerne ansteigt. Im Gegensatz dazu nimmt diese tagsüber durch Kernverschmelzung wieder ab (BÜCHNER).

Als Kriterium für die Tagesrhythmik der Zellteilung gilt die Anzahl der Mitosen im histologischen Präparat, der Mitose- und 3-H-Thymidin-Index zu verschiedenen Tageszeiten.

Bei den Substanzen, welche eine Lebervergrößerung bewirken oder lebercarzinogen sind, wurde deshalb sorgfältig auf die Einhaltung einer konstanten Zeit der Tötung geachtet. Trotzdem muß noch offen bleiben, ob die verwendeten, im Zentralnervensystem wirkenden Substanzen den zirkardianen Rhythmus verschieben.

Der Vergleich der histometrischen und autoradiographisch-histologischen Ergebnisse ergibt den eindeutigen Befund, daß die Lebervergrößerung durch die hier untersuchten, in der Leber metabolisierten Stoffe, auf verschiedenen Prozessen beruht. Phenobarbital, das als eines der stärksten, Mikrosomenenzyme anregenden Stoffe anzusehen ist, zeigt bei der von uns angewandten Auszählung des Gesamtleberläppchens im Durchschnitt das Bild einer überwiegenden Zellhypertrophie für das Parenchymgewebe und eine Hyperplasie für das Extraparenchymgewebe. Dabei ist das Verhältnis von Parenchym/Extraparenchym normal, also keine überschießende Bindegewebsvermehrung vorhanden. Die Betrachtung des histologischen Bildes ergibt jedoch, daß eine feinere Differenzierung notwendig ist. In der Peripherie erwiesen sich nämlich die Zellen als normal groß, während sie im Zentrum überdimensional vergrößert waren. Wie auch unter normalen Bedingungen spielten sich auch unter Phenobarbitalwirkung vornehmlich in der Intermediärzone die DNS-Synthesen ab. Auch nach 30wöchiger Applikation hat sich an diesem Bild nichts geändert. Zeichen von Degeneration und Tumorwachstum wurden nicht gefunden.

Zum Vergleich dazu ist bei Halothan die Parenchymhypertrophie wesentlich geringer. Das Gesamtbild des Parenchyms ist wesentlich ungleichmäßiger, da sich häufig große und kleine Zellen ungeordnet nebeneinander finden. Besonders auffallend

ist die relative Zunahme von Extraparenchymzellen. Es kam zwar nicht zu einer Extraparenchymproliferation im Sinne einer Cirrhose, jedoch waren umschriebene Bindegewebs-Regeneratknötchen in den Präparaten zu erkennen. In Übereinstimmung mit chemisch-analytischen Befunden des Instituts zeigt sich in allen Halothanlebern eine ausgeprägte Verfettung. Bemerkenswert ist außerdem, daß im histologischen Bild im Zentrum degenerative Veränderungen sichtbar sind.

Alle bei Halothan gefundenen Veränderungen finden sich auch bei Methoxyfluoran, nur in verstärktem Umfang. Neben der starken Verfettung imponiert die Extraparenchymbildung, die bereits nach 18 Wochen zur Ausbildung bis ins Zentrum reichender Bindegewebssepten führt. Diese Befunde bilden eine interessante Parallele zur Alkoholfettleber am Menschen. Nach THALER geht nämlich das Verfettungsstadium hier ebenfalls in ein cirrhotisches über, wobei diskutiert wird, ob das verfettete Parenchym der Anlaß für die Bindegewebsproliferation ist.

DÄNA, in der hier angewandten sicher carzinogenen Dosis (Diss. MICHEL), führte an Läppchen, die nicht carzinomatös verändert waren, zu einer mehr oder weniger ausgebildeten Cirrhose. Hier wurde keine zentrale Hypertrophie in den Läppchen gefunden, Fetteinlagerungen fehlten. Bindegewebswucherung war etwa in gleichem Umfang wie bei Methoxyfluoran zu finden.

Bei der Kombination DÄNA-Phenobarbital fand MICHEL eine signifikante Verminderung der carzinogenen Wirkung. Eine Parallele dazu bilden die histologischen Befunde. Hier fehlt die Bindegewebsproliferation weitgehend. Im Parenchym selbst herrschte das typische Phenobarbitalbild vor. Offenbar wird, wir bereits ausgeführt, DÄNA durch die durch Phenobarbital erhöhte mikrosomale Fermentaktivität zu einem erheblichen Teil entgiftet.

Bei den Kombinationen DÄNA-Halothan und DÄNA-Methoxyfluoran ist die Bindegewebsproliferation gleichstark wie bei der iso-

lierten Applikation der Substanzen. Am Leberparenchym ist eine Verschiebung zur zentralen Hypertrophie zu finden. Es sieht so aus, als ob die DÄNA-Wirkung prävaliere, wobei die bei den Halogenkohlenwasserstoffen typische Leberverfettung aufgehoben ist.

Insgesamt zeigen die Befunde, daß die durch Fremdstoffmetabolismus erzeugten Lebervergrößerungen mit histologischen und autoradiographischen Methoden klar zu differenzieren sind. Es heben sich zwei Gruppen heraus. Die eine wird von einer Substanzgruppe nach dem Typ des Phenobarbitals gebildet, dessen primäre Wirkung eine vermehrte Bildung mikrosomaler Fermente ist. Diese Gruppe ist gekennzeichnet durch eine vorherrschende Hypertrophie des Parenchyms, die nach Einstellung des Gleichgewichtes sich besonders stark im zentralen Teil des Läppchens manifestiert, während in der Peripherie die Zellen normal groß sind. Eine erhöhte DNS-Synthese und ein Mitose-Index ist nicht vorhanden, eine Bindegewebsreaktion fehlt.

In der zweiten Gruppe, repräsentiert von Halothan und Methoxyfluoran fehlt die mikrosomale Fermentinduktion. Eine Leberverfettung über lange Zeit ist kennzeichnend. Auch nach 30wöchiger Versuchszeit ist DNS-Umsatz und Mitoserate erhöht. Die Hypertrophie ist geringer ausgeprägt als bei Phenobarbital. Ein weiteres Charakteristikum ist die Bindegewebsproliferation, die je nach Substanz verschieden stark ist.

VI. Zusammenfassung

1) An der Leber der normalen weißen Maus wurde Mitose- und 3-H-Thymidin-Index in regelmäßigen zeitlichen Abständen untersucht. Es ergab sich ein tageszeitlich abhängiges rhythmisches Verhalten mit einem Maximum um 8 h für den 3-h-Thymidin-Index und um 12 h für den Mitose-Index und den Minimawerten um 24 h bzw. 16 h. Auch die Lebergröße zeigt hirkardiane Schwankungen. Diese sind in erster Linie auf entsprechende Veränderungen des Zellvolumens zurückzuführen.

2) Die im Langzeitversuch durch Fremdstoffmetabolismus erzeugte Lebervergrößerung läßt sich in zwei Typen einteilen:
   a) den Phenobarbitaltyp: dieser ist durch eine vorwiegend zentrale Zellhypertrophie und weitgehend indifferentes Verhalten der Läppchenperipherie gekennzeichnet. Dabei verhält sich die Bindegewebsvermehrung proportioniert zum Leberwachstum.
   b) den Halothan- und Methoxyfluorantyp: bei diesem ist die Zellhypertrophie geringer und über das ganze Leberläppchen verteilt ist. Verfettung der Parenchymzellen und stärkeres, also unproportioniertes Bindegewebswachstum sind weitere Merkmale. Degenerative Veränderungen von Parenchymzellen sind relativ häufig.

3) Diäthylnitrosamin führte bei der von und verwendeten Dosis von 7 mg/kg zur Tumorbildung. In den noch nicht von Tumoren befallenen Leberläppchen bestand eine Lebercirrhose, die Bindegewebsvermehrung war stark ausgeprägt.

4) Phenobarbital reduzierte die Zahl der von DÄNA induzierten Tumoren. Neben einer starken zentralen Parenchymhypertrophie war eine gegenüber der Reinsubstanz DÄNA stark reduzierte Bindegewebswucherung kennzeichnend.

Tabelle I: Rhythmusversuch

		24 h				4 h		
H_3II	Nr.	Rel.L.G.	G.Zz. (770 G)	Z	Nr.	Rel.L.G.	G.Zz. (770 G)	Z
MaL	343	52,3	12745	28	352	62,5	17580	323
	344	54,7	18140	2	353	54,4	12470	168
	345	51,4	18550	6	354	59,0	15576	80
m		52,8	16478	12		58,6	18875	190
MaD	343		1502	4	352		2148	48
	344		1965	-	353		4420	27
	345		2680	2	354		1656	4
m			2049	2			2841	26
Ma	343		11242	24	352		15400	275
L-D	344		16180	2	353		19050	141
	345		15895	4	354		13925	76
m			14439	10			16125	167
MaB	343		4235	42	352		10591	185
	344		7315	27	353		9859	235
	345		7430	79	354		5852	546
m			6330	49			8767	322
ML	343			16	352			13
	344			10	353			15
	345			25	354			27
m				18				18
MB	343			33	352			51
	344			15	353			58
	345			42	354			100
m				30				70
Mitose-Index L				0,12			0,11	
H_3-Index				0,069			1,03	
$\frac{H_3\text{-Index}}{\text{Mitose-Ind.}}$				0,575			9,68	
Mitose-Index B				0,47			0,8	
H_3-Index				0,774			3,672	
$\frac{H_3\text{-Index}}{\text{Mit.-Ind.}}$				1,63			4,59	

Tabelle I: Rhythmusversuch (Fortsetzung)

	8 h				12 h			
H_3II	Nr.	Rel.L.G.	G.Zz. (770 G)	Z	Nr.	Rel.L.G.	G.Zz. (770 G)	Z
MaL	361	53,6	11090	77	310	63,2	13200	68
	362	61,2	11130	194	311	65,1	15426	39
	363	61,8	17458	393	312	50,0	18617	127
m		58,7	13226	195		59,4	15748	78
MaD	361		770	10	310		770	10
	362		1154	40	311		1692	2
	363		2218	70	312		1618	23
m			1381	40			1360	12
Ma	361		10320	67	310		12430	58
L-D	362		9976	154	311		13734	37
	363		15240	243	312		17000	104
m			11879	155			14388	66
MaB	361		5320	74	310		7161	56
	362		5010	147	311		8255	59
	363		7007	64	312		9365	125
m			5779	96			8260	80
ML	361			30	310			41
	362			12	311			44
	363			36	312			93
m				26				59
MB	361			88	310			82
	362			99	311			81
	363			104	312			110
m				97				59
Mitose-Index L			0,126	0,218			0,19	
H_3-Index			1,22	1,304			0,418	
$\frac{H_3\text{-Index}}{\text{Mit.-Ind.}}$			9,36	5,98			0,45	
Mitose-Index B			0,519	1,67			0,71	
H_3-Index			1,55	1,64			0,71	
$\frac{H_3\text{-Index}}{\text{Mit.-Ind.}}$			0,33	0,97			1,35	

Tabelle I: Rhythmusversuch (Fortsetzung)

	16 h				20 h			
H_3II	Nr.	Rel.L.G.	G.Zz. (770 G)	Z	Nr.	Rel.L.G.	G.Zz. (770 G)	Z
MaL	322	57,9	29250	39	334	59,0	14425	229
	323	54,5	16005	28	335	52,0	22325	15
	324	52,4	17342	13	336	48,5	14287	48
m		54,9	20866	27		53,2	17012	97
MaD	322		4010	-	334		870	41
	323		2765	2	335		2580	3
	324		3422	1	336		1887	7
m			3399	1			1779	17
Ma L-D	322		25240	39	334		13555	178
	323		13240	26	335		19745	12
	324		13920	12	336		12400	41
m			17500	26			15180	78
MaB	322		10885	229	334		8850	120
	323		6350	67	335		12240	356
	324		8650	77	336		8325	106
m			8662	148			6138	227
ML	322			22	334			23
	323			12	335			18
	324			13	336			41
m				16				27
MB	322			66	334			45
	323			49	335			39
	324			75	336			61
m				64				48
Mitose-Index L				0,091			0,096	
H_3-Index				0,148			0,530	
$\frac{H_3\text{-Index}}{\text{Mit.-Ind.}}$				1,626			5,52	
Mitose-Index B				0,738			0,74	
H_3-Index				1,708			3,69	
$\frac{H_3\text{-Index}}{\text{Mit.-Ind.}}$				2,31			5,0	

Tabelle II: Rhythmusversuch

3-H-Thymidin

		Auszähl. der Läppchen	Faktor	Mit Lok	H_3 Lok
0 h	Z	38,3	1	7	8
	J	182,2	4,7	12	12
	P	302,6	7,9	11	10
		523,2		30	10
4 h	Z	33,1	1	10	9
	182,4		5,5	8	9
	P	276,3	8,3	12	12
		491,2			
8 h	Z	32,3	1	10	10
	J	153	4,7	9	9
	P	237,7	7,3	11	11
		423,1			
12 h	Z	29,5	1	8	9
	J	144,7	4,9	11	10
	P	203,3	6,8	11	11
		376,5			
16 h	Z	26,4	1	7	8
	J	163,7	6,5	12	10
	P	233	8,8	11	12
		433,2			
20 h	Z	24,1	1	9	8
	J	164,6	6,8	12	10
	P	263,6	10,9	9	12
		452,4			
		N = 9			
		10,9	11	10	

Tabelle II: Rhythmusversuch (Fortsetzung)

		Colchizin			3-H-Thymidin + Colchizin			
		Auszähl. der Läppchen	Fakt.	Mit. Lok	Auszähl. der Läppchen	Fakt.	Mit Lok	H_3 Lok
0 h	Z	27,5	1	15	37,7	1	12	9
	J	143,5	5,2	11	204,1	5,4	16	10
	P	210,1	7,6	4	199	8,9	2	11
		381,2			580		30	
4 h	Z	24,7	1	15	37	1	10	16
	J	139,3	5,6	11	184,4	4,9	17	12
	P	199	8,0	4	309,6	8,3	3	2
		363,1			529,8		30	
8 h	Z	23,1	1	12	30,6	1	8	14
	J	145,5	6,2	15	178,6	5,8	18	9
	P	228,2	9,8	3	274,1	8,9	4	7
		396,8			483,3		30	
12 h	Z	27,7	1	10	27,6	1	8	11
	J	129,2	4,6	19	177,2	6,4	18	12
	P	190,3	6,8	1	295,7	10,7	4	7
		347,2			500,5		30	
16 h	Z	25,8	1	14	26,5	1	3	12
	J	161,5	6,2	14	150,7	5,6	24	14
	P	216,1	8,3	2	226	8,5	3	4
		403,4			403,2			
20 h	J	27,1	1	12	21,7	1	9	11
	J	136,4	5,8	16	136,4	6,2	19	15
	P	205,2	8,6	2	205,2	9,4	2	4
		419,8			363,3			
		N = 9			N = 9			

Tabelle III: Rhythmusversuch

3-H-Thymidin

Gruppe	N	GZz.L	Ma L	H_3-J	Mit L	Mit-J	Gz.Z.B	Ma B	H_3-J.B	Mit B	Mit-J.B
0 Uhr	3	14439	10	0,08	18	0,13	6330	49	0,81	30	0,52
m	3	± 1600		0,11		0,06	± 965		ß,38	0	0,29
4 Uhr	3	16125	167	1,02	18	0,12	8767	322	4,49	70	0,93
m	3	± 1518		0,67		0,06	± 1460		4,21		0,68
8 Uhr	3	11879	145	1,26	26	0,22	5779	95	1,60	97	1,49
m	3	± 1708		0,53		0,09	±621		1,16		0,37
12 Uhr	3	14388	66	0,45	59	0,40	8260	80	0,94	52	1,10
m	3	± 1372		0,17		0,13	± 637		0,34		0,1
16 h	3	17500	26	0,15	16	0,09	8662	148	1,56	64	0,75
m	3	± 3770		0,06		0,001	± 1340		1,01		0,13
20 Uhr	3	15180	78	0,57	27	0,20	6138	227	1,85	48	0,52
m	3	± 2586		0,66		0,12	± 1228		0,92		0,21

Colchizin

0 Uhr	3	14415			19	0,14	8338			58	0,77
m		± 1268				0,02	± 675				0,54
4 Uhr	3	12628			34	0,26	7350			60	0,79
m		± 835				0,08	± 660				0,17
8 h	3	10926			41	0,38	6849			47	0,70
m		± 564				0,12	± 417				0,17
12 Uhr	3	9319			35	0,39	6516			64	0,99
m		± 717				0,11	± 353				0,07
16 Uhr	3	14966			33	0,23	8452			64	0,83
m		± 2010				0,15	± 1470				0,14
20 Uhr	3	15641			29	0,19	9044			67	0,76
m		± 350				0,04	± 1030				0,11

Tabelle III: Rhythmusversuch (Fortsetzung)

3-H-Thymidin + Colchizin

Gruppe	N	GZz.L	Ma L	H_3J	Mit L	Mit-J	GzZ.B	Ma B	H_3-J.B	Mit B	Mit-J.B
0 Uhr	3	13982	15	0,10	18	0,13	7918	48	0,61	39	0,50
m		± 1120		0,07		0,02	± 833		0,11		0,20
4 Uhr	3	12560	51	0,36	16	0,13	7430	124	1,62	35	0,46
m		± 1340		0,59		0,04	± 536		1,23		0,17
8 Uhr	3	13226	58	0,44	9	0,07	6365	204	3,54	71	1,20
m		± 123		0,51		0,02	± 747		3,08		0,58
12 Uhr	3	13515	39	0,29	35	0,26	6776	108	1,74	100	1,53
m		± 404		0,15		0,05	± 848		0,98		0,39
16 Uhr	3	16308	14	0,08	14	0,09	9252	115	1,13	54	0,58
m		± 4200		0,02		0,03	± 1362		0,69		0,06
20 Uhr	3	11848	42	0,37	17	0,14	6853	124	1,82	37	0,54
m		± 758		0,41		0,07	± 452		1,62		0,12

Thal

12 Uhr	10	15961			73	0,45	5530			22	0,43
m		± 465				0,32	± 718				0,18

Tabelle IV: Rhythmusversuch

	Schmidt leicht						Schmidt schwer						Thal					
	L-D	Mit L	Mit Ind. L	B	Mit B	Mit Ind. B	2-D	Mit L	Mit Ind. L	B	Mit B	Mit Ind. B	L-D	Mit L	Mit Ind. L	B	Mit B	Mit Ind. B
4 h	16431	6	0,03	5325	14,5	0,27												
8 h	15892	0,5	0,003	6430	17	0,26	18056	2	0,011	6230	14	0,22						
10h	19746	6	0,03	12670	22,5	0,17	15996	1	0,006	7660	7	0,09						
11h	18290	7,5	0,042	7795	25,5	0,32												
12h m	17930	5	0,018	7575	19	0,26	16022	1	0,006	8832	6	0,067	15961 ± 465	73	0,45 0,12	5530 ± 718	22	0,43
14h	19252	11,5	0,019	9622	30	0,31	20612	2	0,009	13108	11	0,083						
16h	19580	25	0,019	10072	22	0,2	20402	1	0,004	3740	14	0,16						
17h	18341	2	0,01	7480	18,5	0,25												
18h	17535	11	0,06	8120	21	0,25	22160	3	0,013	7550	19	0,25						
20h	18186	5	0,026	8660	15	0,17	19150	4	0,02	10300	24	0,23						
22h	18284	0,5	0,003	9035	17,5	0,19												
24h	14621	4	0,27		11	0,17												
	N = 2						N = 1						N = 10					

Tabelle V: Rhythmusversuch

		3-H-Thymidin			Schmidt leicht		Schmidt schwer	
		Ausz. der Läppch.	Mit Lok	H_z Lok	Ausz. der Läppch.	Mit Lok	Ausz. der Läppch.	Mit Lok
4 h	Z	33,1	10	9	41	14		
	J	182,4	8	9	155	11		
	P	276,3	12	12	258	5		
		492			454			
8 h	Z	32,2	10	10	51	9	29	13
	J	153	9	9	224	14	181	13
	P	237,7	11	11	325	7	232	4
		423			600		443	
10 h	Z				39	9	33	9
	J				215	14	172	16
	P				345	7	267	5
					599		472	
11 h	Z				47	12		
	J				215	12		
	P				339	6		
					601			
12 h	Z	29,5	8	9	37	12	31	12
	J	144,7	11	10	196	13	179	11
	P	203,3	11	11	307	5	233	7
		376			540		443	
Thal	Z	48	5,8					
	J	189	19,8		N = 30			
	P	317	4,4					
		554						
14 h	Z				54	10	33	9
	J				233	15	182	12
	P				320	5	251	9
					607		466	
16 h	Z	26,4	7	8	39	12	37	8
	J	163,7	12	10	184	14	192	15
	P	233	11	12	357	4	285	7
		423			580		514	
17 h	Z				38	12		
	J				261	15		
	P				311	3		
					610			

Tabelle V: Rhythmusversuch (Fortsetzung)

		3-H-Thymidin			Schmidt leicht		Schmidt schwer	
		Ausz. der Läppch.	Mit Lok	H_3 Lok	Ausz. der Läppch.	Mit Lok	Ausz. der Läppch.	Mit Lok
18 h	Z				37	15	30	11
	J				177	11	180	11
	P				244	4	282	8
					458		492	
20 h	Z	24,1	9	8	29	12	32	15
	J	164,6	12	10	161	14	172	8
	P	263,6	9	12	222	4	212	7
		452			412		416	
22 h	Z				34	13		
	J				154	14		
	P				245	3		
					433			
24 h	Z	38,3	7	8	28	15		
	J	182,2	12	12	223	12		
	P	302,6	11	10	282	3		
		523			533			
		N = 9			N = 6		N = 3	

Tabelle VI: Langzeitversuch 18 Wochen

	K	Ma	N	Ma	Ph	Ma	H	
Ma	14290	5	9750	3	7500	33	9460	6
L	14060	7	17870	7	10130	9	10095	5
	14750	5	12580	17	7990	-	10615	5
	13740	-	15040	-	8880	11	10165	7
			14210	9	9810	9		
	14212		13890		8865		10083	
	100%		97%		62%		70%	
Ma	2980		1630		1470		2370	
D	2840		3700		2530		2295	
	3250		3820		1660		2605	
	2880		3820		2310		2455	
			3520		2280			
	2987		3046		2050		2431	
	100%		101%		68%		81%	
Ma	11310	5	8120	3	6030	33	7090	6
L-D	11220	7	14170	7	7600	9	7800	5
	11500	5	10020	17	6330	-	8010	5
	10860	-	11220	-	6570	11	7710	7
			10690	9	7530	9		
	11225	4	10844	7	6815	15,4	7652	6,4
	100%		96%		60%		68%	
MaB	12670	12	8290	4	11040	45	12700	34
	13470	57	12900	29	11800	17	15600	9
	10080	21	12490	34	9760	22	16960	15
	10150	3	10520	19	9900	26	14570	11
			13270	17	6930	17		
	11592	23	11494	20	9486	25	14960	14
	100%		99%		81%		129%	

Tabelle VI: Langzeitversuch 18 Wochen (Fortsetzung)

	Mt	Ma	D	Ma	DN	Ma	DPh	
Ma	10320	39	10660	242	9690	-	12950	25
L	7350	125	10830	112	7790	114	11950	9
	10840	87	10630	214	11790	42	15560	7
	7260	63	9910	98	12980	112	14120	-
	8840	42	9200	201	10810	306	15740	17
	9122		10244		10612		14058	
	64%		72%		74%		98%	
Ma	1350		2160		1320		1960	
D	1140		2370		1090		2220	
	1680		1870		1410		2860	
	1230		2200		1540		1510	
	1710		1960		1210		2290	
	1422		2112		1314		2168	
	47%		70%		43%		72%	
Ma	8970	39	8500	242	8370	-	10990	25
L-D	6210	125	8460	112	6700	114	9730	9
	9160	87	8760	214	10380	42	12700	7
	6030	63	7710	98	11440	112	12610	-
	8130	42	7240	201	9600	306	13450	17
	7700	71	8132	173	9298	114	11890	14
	68%		72%		82%		105%	
MaB	52740	41	55390	218	44200	14	15270	157
	63250	91	43050	37	50260	143	13230	217
	66160	132	57620	165	51720	41	17460	7
	54720	88	52450	191	54210	137	18460	-
	57680	46	46560	178	53580	317	23130	23
	58130	79	51014	157	50794	130	17510	96
	501%		440%		438%		151%	

Tabelle VI: Langzeitversuch 18 Wochen (Fortsetzung)

	DH	Ma	DPhH	Ma	DMt	Ma
Ma	17550	71	16890	102	13610	132
L	12220	47	11320	39	18820	133
	13750	15	11850	33	16110	7
	14260	63	12240	41	18150	
	14372		13255		17030	
	101%		93%		119%	
Ma	1740		2040		1330	
D	1260		1300		1030	
	1470		1490		1090	
	1560		1530		1410	
					1530	
	1452		1545		1278	
	48%		51%		42%	
Ma	15810	71	14850	102	12580	187
L-D	10960	47	10020	39	17730	132
	12280	15	10360	33	14700	133
	12700	63	10710	41	17520	7
	12920	49	11710	53	15822	138
	115%		104%		140%	
MaB	43700	65	13680	98	52470	217
	51720	17	12280	96	60130	157
	54210	129	12040	47	55860	212
	43480	129	13210	68	58050	12
	48692	85	12989	77	55064	147
	420%		112%		475%	

Tabelle VII: Langzeitversuch 30 Wochen

		H	Ma		Mt	Ma		Ph	Ma
MaL	231	10460	5	239	7460	14	221	7285	-
	232	9060	6	240	10290	19	222	6785	11
	223	8980	9	227	7440	27	233	8700	7
	224	8625	5	226	7470	31	234	6435	-
	225	7400	58				235	8965	2
m		8905			8165			7814	
		100%			91%			87%	
MaD		1980			1110			1455	
		1470			1920			1595	
		1690			1200			1860	
		1680			1450			1305	
		1370	1					1725	
m		1638			1420			1588	
Ma		8430	5	239	6350	14		5830	-
L-D		7590	6	240	8370	19		6190	11
		7230	9	227	6240	27		6740	7
		6945	5	226	6020	31		5130	-
		6030	58					7240	2
m		7267	14		6745	22		6226	4
		100%			92%			85%	
MaB		14760	9		42360	29		9285	-
		15430	21		41570	57		7710	3
		17130	14		44580	53		9765	21
		16050	6		40770	74		9405	4
		14580	37					9375	23
m		15600	17		42570	53		9108	
		100%			272%			58%	

Tabelle VII: Langzeitversuch 30 Wochen

		N	Ma		K	Ma
MaL	236	10080	2	242	13245	9
	237	8975	11	243	14370	8
	238	12045	2	244	14490	-
	239	10725	5	245	11655	2
	230	13260	-			
m		11017			13439	
		123%			150%	
MaD		2205			3135	
		1265			3990	
		2910			4230	
		2355			2790	
		2865				
m		2320			3536	
		7875	2		10110	9
		7710	11		10380	8
		9135	2		10260	-
		8370	5		8865	2
		10395				
m		8697	4		9903	5
		119%			136%	
		8280	7		12015	21
		9330	37		11400	17
		10035	9		11895	7
		13050	9		12390	14
		11880	27			
m		10515	17		11925	14
		67%			76%	

Tabelle VIII: Langzeitversuch 18 Wochen

	N	G.Zz.L	H_3 Ma	H_3- I.	GZz.B	H_3 Ma	H_3- I.	Rel.Le= bergew.
K	4	14212	4	0,03	11592	23	0,19	50,9
m		± 300		0,02	± 1475		0,17	
tk								
pk								
N	5	13890	20	0,05	11994	7	0,17	46,3
m		± 2000		0,05	± 1680		0,09	
tk				0,88			0,21	
pk				0,40			0,80	
Ph	5	8865	15,4	0,15	9486	25	0,26	81,8
m		± 900		0,17	± 1360		0,10	
tk				1,38			0,76	
pk				0,20			0,50	
H	4	10083	6,4	0,06	14960	14	0,12	73,8
m		± 260		0,01	± 1325		0,10	
tk				2,34			0,67	
pk				0,05			0,60	
Mt	5	9122	71	0,84	58130	79	0,14	70,9
m		± 1380		0,52	± 3800		0,06	
tk				3,08			0,66	
pk				0,01			0,60	
D	5	10244	173	1,69	51014	157	0,30	53,9
m		± 540		0,64	± 4600		0,13	
tk				5,10			1,14	
pk				0,001			0,03	
DN	5	10612	114	1,10	50794	130	0,25	54,5
m		± 1500		1,11	± 2760		0,22	
tk				1,90			0,44	
pk				1,10			0,70	
DH	4	14372	49	0,33	48692	85	0,17	67,0
m		± 1750		0,15	± 3800		0,10	
tk				3,97			0,24	
pk				0,01			0,80	
DMt	4	17030	138	0,82	55064	147	0,27	85,7
m		± 1620		0,46	± 3600		0,15	
tk				3,38			0,75	
pk				0,01			0,50	
DPh	5	14058	14	0,09	17510	96	0,54	68,1
m		± 1280		0,08	± 2580		0,72	
tk				1,43			0,93	
pk				0,20			0,40	

Tabelle VIII: Langzeitversuch (Fortsetzung)

18 Wochen

	N	G.Zz.L	H_3 Ma	H_3- I.	GZz.B	H_3 Ma	H_3- I.	Rel.Le= bergew.
DPhH	4	13255	53	0,39	12988	77	0,60	114,8
m		± 2000		0,15	± 650		0,18	
tk				4,92			3,30	
pk				0,001			0,02	
K	4	13439	5	0,03	11925	14	0,12	52,7
m		± 975		0,02	± 275		0,05	
tk							0,19	
pk							0,90	
N	5	11017	4	0,04	10515	17	0,17	50,3
m		± 1340		0,04	± 1560		0,14	
tk				1,17			0,80	
pk				0,30			0,40	
Ph	5	7814	4	0,05	9108	10	0,11	82,0
m		± 1020		0,07	± 520		0,11	
tk				1,08			0,09	
pk				0,30			0,90	
H	5	8905	14	0,15	15600	17	0,11	70,3
m		± 660		0,07	± 820		0,09	
tk				0,45			0,19	
pk				0,70			0,90	
Mt	4	8165	22	0,29	42570	53	0,13	71,3
m		± 1000		0,12	± 1100		0,05	
tk				0,45			0,23	
pk				0,70			0,80	

30 Wochen

Tabelle IX: Langzeitversuch 18 Wochen, Lok. Läppchen

		GzZ pro Läppch.	Läppchen	in %	Lz/LD cm^2	Mit-Lok	in %	H_3-Lok	in %
K	Z		22,5	8,2	1,79	4	14	4,6	24,1
	J		114 - 1	41,5	1,73-0,015	17	56	7,2	37,4
	P	275,5 - 5,1	139 - 4,1	50,3	1,41-0,041	9/30	30	7,4/192	38,5
D	Z		22	7,2	1,75	7,6	25,2	13	43
	J		120	39,2	1,82	12,4	41,5	13	43
	P	306,8 - 6	164,8-6	53,6	1,67-0,061	10/30	33,3	4/30	14
Ph	Z		11,0-0,2	4,7	0,875-0,001	6,4	21,3	12	58
	J		76,2-4	32,5	1,16-0,062	9,2	30,7	6,4	31
	P	235,7 -13,4	148,5-9,2	62,8	1,51-0,093	14,4/30	48,9	2,2/20,6	11
H	Z		12,4	5,5	0,98	5	16,7	7,6	42
	J		86,4-2,9	38,5	1,31-0,044	16,4	54,7	7,4	40,8
	P	225,8 - 8,6	116 - 5,7	56	1,18-0,058	8,6/30	28,6	2,6/17,2	
Mt	Z		14,5	7,4	1,5	6	20	14	46,5
	J		76,5 - 4	39,4	1,15-0,062	13,4	44,7	12,6	42
	P	194 - 8	103 - 4	53,2	1,05-0,041	10,5/30	35,3	3,4/30	11,5

Tabelle IX (Fortsetzung): Langzeitversuch 30 Wochen, Lok. Läppchen

		GzZ pro Läppch. Lebende L.	Läppchen	in %	Lz/LD cm^2	Mit-Lok	in %	H_3-Lok	in %
K	Z		12,3	4,7	0,97	4,3	19,3	3,3	33,3
	J		106	40,0	1,62	11,6	51,7	4,6	46,5
	P	266,5 - 1	148,2 - 1	55,3	1,54 - 0,001	6,3/22,2	29	2/9,9	20,2
D	Z								
	J		Alle Tiere bereits tot						
	P								
Ph	Z		11,6	6,2	0,928	6,2	22	11,6	48,8
	J		56,8-1,2	30,4	0,86-0,018	9,8	35	9,8	41,2
	P	186,4 -10,8	118 - 7,6	63,4	1,20-0,077	11,8/27,8	43	2,4/23,8	10
H	Z		14,3	7,3	1,14	8	26,5	5,6	34
	J		77,5 - 2	39,8	1,18-0,03	17,2	57,5	6	36,6
	P	195,8 - 6	104 - 4	52,9	1,05-0,041	4,8/30	16,0	4,8/16,4	29,4
Mt	Z		11,5	7,9	0,89	8,2	31,4	12,7	45,5
	J		63,5	43,5	0,96	11	42	9,2	33,1
	P	145,5	70,5	51,4	0,76	7/26,2	26,6	6,0	21,4
Ph 20 Tg			21	6,2	1,65				
			121 - 8	37,5	1,84 -0,12				
		321 - 19	179 - 11	56,3	1,81 - 0,11				

Tabelle X

	Verhältnis der Zell= zahlen	Zellzahl Parenchym	Zellzahl Extrapar= enchym	Verhältnis mark.P. zu mark.Extrap.	Verhältnis Extrapar. zu Rel. Lebergew.	Rel.Le= berge= wicht	Verhältnis Parenchymz. zu Rel.Le= bergewicht	Verhältnis Par. zu Extrapar. in %
K	1:0,8	14212	11592	1:6	1:4,4	50,9	1:3,5	56:44
D	1:5	10244	51014	1:0,9	1:1	53,9	1:5,1	17:83
Ph	1:1,07	8865	9486	1:2	1:8,8	81,8	1:9,2	48:52
N	1:0,8	13890	11494	1:3	1:4	46,3	1:3,4	54:46
H	1:1,5	10083	14960	1:2	1:5	73,8	1:7,3	40:60
Mt	1:6,4	9122	58130	1:1	1:1,3	70,9	1:78	14:86
DPh	1:1,25	14058	17510	1:11	1:4,2	68,1	1:4,8	44:56
DN	1:4,8	10612	50794	1:1,1	1:1	54,5	1:51	19:81
DH	1:3,3	14372	48692	1:1,7	1:1,4	67,0	1:4,7	23:77
DPhH	1:0,97	13255	12988	1:1,3	1:8,9	114,8	1:8,7	51:49
DMt	1:3,2	17030	55064	1:1,1	1:1,6	85,7	1:5	23:77
K	1:0,89	13439	11925	1:3	1:4,3	52,7	1:4	53:47
Ph	1:1,16	7814	9108	1:2	1:9	82,0	1:10,3	46:54
N	1:0,95	11017	10515	1:4	1:4,7	50,3	1:4,5	51:49
H	1:1,75	8905	15600	1:1,1	1:3,6	70,3	1:7,9	36:64
Mt	1:5,2	8165	42570	1:2	1:1,7	71,3	1:9	16:84

VIII. Literatur

Bade,E.G., I.L.Sadnik, C.Pilgrim, W.Maurer
Autoradiographic Study of DNA-Synthesis in the Regenerating Liver of the Mouse.
Experimental Cell Research
Virchows Archiv path. Anat. 1964

Bucher,O. und P.Suppan
Amitose et fusion nucléaires au cours du rythme cardian.
The Cellular Aspects of Biorythms
Springer-Verlag 1968

Büchner,F., E.Grundmann und Oehlert
Die experimentelle Kanzerisierung der Parenchym=zelle. Dt.med.Wochenschrift 39, 1845 (1961)

Bünning,E. Circardiane Rhythmik, ein Überblick
The Cellular Aspects of Biorythms
Springer-Verlag 1968

Elling,W. The Circardian Rhythms of Nucleic Acids.
The Cellular Aspects of Biorythms.
Springer-Verlag 1968

Hallberg, Y.L.Tong, E.A.Johnson
Circardian System-Phase - An Aspect of Temporal Morphology.
The Cellular Aspects of Biorythms
Springer-Verlag 1968

Korb Pathologie-Vorlesung 1967-68, Winter

Küllmer,R. Makroskopische und mikroskopische Veränderungen an der Leber nach chronischer Einwirkung von Fremdstoffen. Med. Diss. Marburg 1966

Jerusalem,Chr., O.Müller und H.v.Mayersbach
Circardian Ultrastructural Changes in Liver Cells.
The Cellular Aspects of Biorythms.
Springer-Verlag 1968

Kunz,W., G.Schaude, W.Schmid und M.Siess
Lebervergrößerung durch Fremdstoffe.
Naunyn-Schmiedeb. Arch.Pharm.u.exp.Path. 254, 470 1966

Leduc,E.H. und W.Wilson
Injury to Liver Cells in Carbon Tetrachloride Poisoning.
A.M.A. Archives of Pathology, Februar 1958, Vol.65 pp. 147-157

Leske,R. Technical Factors Involved in the Histochemical Determination of the Circardian Changes of Liver Glycogen.
The Cellular Aspects of Biorythms
Springer-Verlag 1968

Michel,R.F. Die Beeinflussung der Diäthylnitrosamincarcinogenese durch lebervergrößernde Fremdstoffe.
Med. Diss. Marburg 1968

Mayersbach,H.v.
Seasonal Influences on Biological Rythms of Standardized Laboratory Animals.
The Cellular Aspects of Biorythms
Springer-Verlag 1968

Oehlert, W.Hämmerling und F.Büchner
Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der DNS-Synthese in der Leber der Ratte nach Teilhepatektomie.
Pathologisches Institut Freiburg 1961

Pentren,T. und A.Sollberger
Developmental Rhythms.
The Cellular Aspects of Biorythms.
Springer-Verlag 1968

Pilgrim,Th. Autoradiographic Investigations with ^{3}H-Thymidin on the Influence of the Diurnal Rhythm on Cell Proliferations Kinetics.
The Cellular Aspects of Biorythms.
Springer-Verlag 1968

Preussmann,R. Zum oxydativen Abbau von Nitrosaminen mit enzymfreien Modell-Systemen.
Arzneimittelforschung 14, 769 (1964)

Russel,A., van Dyke, M.B.Chenoweth und A.V.Poznak
Metabolism of volatile Anaestetics.
Biochemical Pharmakologie, 1964, vol.13, 1239-1247

Schimassek,H., W.Kunz und D.Gallwitz
Differenzierung des Leberstoffwechsels unter Halothan. Naunyn-Schmiedeb. Arch. exp. Path. u. Pharm. 251, 195, 1965

Schmid,H. Primärreaktionen krebserregender Stoffe mit Sub'stanzen der Zelle und ihre Hemmung.
Naturwissenschaften Jg.50, 46-47, 1963

Seidel Zoologie-Vorlesung 1965, Sommer

Wilson,W., E.H.Leduc und C.S.Groat
Histogenesis of the Liver.
Annals of the New York Academy of Sciences.
Vol.III, pp. 8-22

Herrn Prof. Dr. W. Schmid danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Ebenso danke ich Frau Dr. G. Schaude für die selbstlose Unterstützung in allen die Arbeit betreffenden Fragen und die zahlreichen Anregungen für die Bearbeitung des Themas.

Herrn Dozent Dr. Trinkaus danke ich für die Durchführung der statistischen Auswertung.

Lebenslauf

Am 29. 8. 1942 wurde ich, Gerd Staudt, als dritter Sohn des Zahnarztes Hermann Staudt und seiner Ehefrau, der Zahnärztin Carola Staudt, geb. Fuchs, in Michelstadt geboren.
Nach dem vierjährigen Besuch der Grundschule meiner Heimatstadt besuchte ich drei Jahre das Gymnasium in Michelstadt, wechselte an das Max-Planck-Gymnasium in Groß-Umstadt über, das ich 1962 verließ, um 1964 am Gymnasium Wald-Michelbach das Abitur zu bestehen. Seit 1964 studiere ich an der Universität Marburg Zahnmedizin, legte im Winter 1966 die zahnärztliche Vorprüfung ab und habe mich für den Sommer 1969 zum zahnmedizinischen Staatsexamen gemeldet.
Seit Winter 1968 studiere ich zusätzlich Medizin. Seit Oktober 1966 arbeite ich an der Fertigstellung vorliegender Arbeit im Pharmakologischen Institut der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. Schmid).

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:
Dimroth, Hennis, Hering, Heuser, Janke, Karlson, Korb, Mahr, Niemeyer, Pantke, Petry, Pfütz, Rodeck, Rohen, Rosemann, Salfeld, Schiff, Schmid, Seidel, Siess, Staib, Strohmeyer, Walcher, Zilliken.